



Etude de l'immunité anti-tumorale à long-terme induite par traitement par un anticorps anti-CD20 de souris porteuses de tumeur

Claire Deligne

► To cite this version:

Claire Deligne. Etude de l'immunité anti-tumorale à long-terme induite par traitement par un anticorps anti-CD20 de souris porteuses de tumeur. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB019 . tel-01138499

HAL Id: tel-01138499

<https://theses.hal.science/tel-01138499>

Submitted on 2 Apr 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse de Doctorat de l'Université Paris 5 – René Descartes

Spécialité :
Immunologie

Ecole Doctorale Bio Sorbonne Paris Cité

Présentée par :
Claire Deligne

Pour obtenir le titre de Docteur de l'université Paris Descartes

**« Etude de l'immunité anti-tumorale à long-terme induite par traitement
par un anticorps anti-CD20 de souris porteuses de tumeur »**

Soutenue le : **16 mars 2015**

Devant le jury composé de :

**Président du Jury
Rapporteur 1
Rapporteur 2
Examineur 1
Examineur 2
Examineur 3
Directeur de Thèse**

**Pr. Eric Tartour
Dr. Christine Bezombes-Cagnac
Dr. Benoit Salomon
Dr. Claude-Agnès Reynaud
Pr. Catherine Thieblemont
Dr. Philippe Bousso
Dr. Jean-Luc Teillaud**

Abréviations

AcM : Anticorps monoclonal

ADCC : Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

AMM : Autorisation de mise sur le marché

BCR : B-cell receptor

BTK : Bruton's tyrosine kinase

CAM : Complexe d'attaque membranaire

CAR : Chimeric Antigen Receptor

CDC : Cytotoxicité dépendante du complément

CG : Centres germinatifs

CHOP : Cyclophosphamide-vincristine-doxorubicine-prednisone

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CRT : Calréticuline

CTLA4 : Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4

DC : Cellule dendritique

DLBCL : lymphome diffus à grandes cellules B

EBV : virus d'Epstein-Barr

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

Fc : Fragment cristallisable

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony stimulating factor

HAMA : Human Anti-Mouse Antibodies

HMGB1 : High-mobility group protein 1

ICOS : Inducible T-cell costimulator

Ig : Immunoglobuline

IFN : Interféron

ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

LAG-3 : Lymphocyte-activation gene 3

LF : Lymphome folliculaire

LLC-B : Leucémie lymphoïde chronique B

MART-1 : Melanoma antigen recognized by T cells 1

MDSC : Myeloid-derived suppressor cells

MIC : MCH class I polypeptide-related sequence

miR : Micro-ARN

MCI : Mort cellulaire immunogénique

pCDs : Cellules dendritiques plasmacytoïdes

PD-1 : programmed cell death 1

PD-L1/2 : programmed cell death ligand 1/2

RFc : Récepteur pour la région Fc des Ig

TCR : T-cell receptor

TGF- β : Tumor growth factor β

TIL : Tumor infiltrating lymphocyte

TLR : Toll-like receptor

TLS : Organes lymphoïdes tertiaires

TNF : Tumor necrosis factor

VEGF : Vascular endothelial growth factor

Résumé

Les anticorps monoclonaux (AcM) ont été utilisés pour traiter des cancers dès le début des années 1980, en particulier lors du travail pionnier de l'équipe de Ronald Levy dans le traitement des lymphomes. Ces traitements ont pendant longtemps été considérés comme une sérothérapie passive à effet immédiat et à court terme. Cependant, au cours de ces dernières années, le concept d'un effet « vaccinal » des anticorps à usage thérapeutique en oncologie a peu à peu vu le jour du fait de réponses cliniques à long terme observées chez certains patients et de différentes études précliniques. En 2010, notre équipe a démontré que des souris immunocompétentes injectées avec les cellules tumorales EL4-huCD20 et traitées avec un AcM anti-huCD20 générant une réponse immunitaire anti-tumorale à long-terme par le biais de mécanismes dépendants de la région constante de l'anticorps et de lymphocytes T CD4⁺. Mon travail de thèse a donc porté sur l'analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels le traitement par un AcM anti-CD20 génère une immunité cellulaire adaptative anti-tumorale. J'ai ainsi pu montrer que le traitement des souris avec l'AcM anti-CD20 conduit à une expansion de lymphocytes Th1 producteurs d'IFN- γ , à l'apparition de lymphocytes T CD4⁺ effecteurs mémoires spécifiques des cellules tumorales CD20⁺, et au blocage de l'expansion de lymphocytes Tregs induite par les cellules tumorales. Le rôle central dans la protection anti-tumorale et la genèse d'une réponse adaptative anti-tumorale joué par l'axe IL-12/IFN- γ et leurs principales sources cellulaires, cellules dendritiques (DCs) et cellules NK, a été démontré par des expériences de neutralisation de ces cytokines, qui provoque une importante diminution du nombre de Th1 spléniques, de déplétion des cellules NK, ainsi que par des analyses phénotypiques qui ont permis d'identifier des DCs activées par le traitement - comme le montre l'expression accrue des molécules de classe II du CMH et de co-stimulation CD80 et CD86 - comme une importante source cellulaire de l'IL-12. Enfin, nous avons pu montrer qu'un variant de l'IL-2, liant préférentiellement le récepteur de l'IL-2 $\beta\gamma$ et faiblement le récepteur de l'IL-2 $\alpha\beta\gamma$ exprimé majoritairement par les Tregs, permettait l'obtention d'une protection anti-tumorale accrue d'animaux porteurs de tumeurs et traités par l'AcM anti-CD20. En conclusion, nous avons démontré qu'un contexte immunitaire pro-tumoral façonné par la présence d'une tumeur en développement peut être inversé par le traitement par un anticorps anti-tumoral, aboutissant à un contexte anti-tumoral. Qu'une telle réponse immunitaire adaptative cellulaire puisse être observée chez des patients atteints de lymphomes, traités par un anticorps anti-CD20, reste encore à être déterminé.

Table des matières

Introduction.....	8
A. Microenvironnement tumoral et intervention thérapeutique	8
a. Immunosurveillance et « immunoediting »	8
i. Un concept historiquement controversé	8
ii. La phase d'élimination.....	11
1. L'immunité innée	11
2. Les TILs et la reconnaissance antigénique	12
iii. La phase d'équilibre.....	17
iv. La phase d'échappement	18
b. Le microenvironnement tumoral	19
i. Infiltrats immunitaires, de bon ou mauvais pronostic ?	19
ii. Les organes lymphoïdes tertiaires	23
v. L'immuno-modulation	24
1. Les molécules immuno-modulatrices dans la tumeur	24
2. Un outil thérapeutique puissant	26
B. Lymphomes B et traitements par AcM.....	28
a. Les lymphomes non-Hodgkiniens	28
i. Epidémiologie	28
ii. Pathogenèse et physiopathologie	31
b. Traitement des lymphomes non-Hodgkiniens.....	33
i. Historique.....	33
ii. La molécule CD20 et les anticorps anti-CD20.....	36
iii. AcM anti-CD20 : modes d'action	40
1. La cytotoxicité dépendante du complément (CDC)	40
2. La cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC)	41
3. La phagocytose par les DCs	43
4. Effets directs.....	45
C. Effets vaccinaux des AcM en oncologie ?	46
a. Données obtenues chez les patients traités par AcM.....	46
b. Descriptions pré-cliniques d'effets vaccinaux des AcM	50

i. L'implication des lymphocytes T CD8 ⁺	50
ii. L'implication des lymphocytes T CD4 ⁺	51
c. Implications cliniques.....	53
i. Co-traitements : immunogénicité de la radiothérapie et de la chimiothérapie	53
ii. Traitements combinatoires : les thérapies de demain.....	55
d. Optimisation de l'effet vaccinal des Ac	57
i. Les AcM bispécifiques.....	57
ii. Couplage à des cytokines	59
Objectifs des travaux de thèse	62
Matériels et méthodes.....	65
Résultats.....	70
Discussion	92
Conclusion et perspectives	106
Bibliographie	108
Annexes	135

Introduction

A. Microenvironnement tumoral et intervention thérapeutique

a. Immunosurveillance et « immunoediting »

i. Un concept historiquement controversé

L'immunosurveillance est un concept selon lequel les cellules du système immunitaire sont capables de reconnaître et de détruire des cellules malignes à l'origine des cancers. L'hypothèse d'une association entre le système immunitaire et la tumorigenèse est émise pour la première fois en 1909 par Paul Ehrlich (Ehrlich, 1909), qui postula que l'incidence des cancers augmentait en absence de système immunitaire. La limitation des connaissances à cette époque ne permit pas d'explorer cette hypothèse et il faudra attendre 1957 pour que MacFarlane Burnet (Burnet, 1957) associe l'apparition des cancers induits par des virus à une réponse immunitaire. Deux ans plus tard, Thomas suggèrera une évolution Darwinienne du système immunitaire étendant son rôle anti-infectieux à une reconnaissance de cellules néoplasiques (Thomas, 1959). L'émergence de cette théorie conduisit alors plusieurs équipes à mener des expériences visant à induire des immunosuppressions expérimentales (comme la thymectomie) pour en étudier l'impact sur la croissance de tumeurs spontanées ou induites. Ces expériences conduisirent à des résultats mitigés (Grant et Miller, 1965 ; Nishizuka et al., 1965). En 1966, les souris Nude, athymiques, étaient décrites (Flanagan, 1966), offrant la possibilité d'un modèle d'immunodépression et c'est en 1974 qu'Osias Stutman utilise ces animaux pour démontrer que l'incidence et le temps moyen d'apparition de tumeurs induites par un agent chimique, le 3-méthylcholanthrène, sont identiques chez des souris sauvages et des souris Nude (Stutman, 1974). Ces expériences contribueront à mettre sous le boisseau la théorie de l'immunosurveillance pendant près de vingt ans. Cependant, d'importants biais à cette expérience seront ultérieurement mis à jour, comme la présence d'un système immunitaire inné complet et fonctionnel chez ces animaux, vraisemblablement capable de s'activer face à l'apparition de cellules tumorales (Maleckar et Sherman, 1987). Le retour de la théorie de l'immunosurveillance se fera dans les années 1980, avec la description d'antigènes tumoraux ou d'antigènes « associés » aux tumeurs, l'utilisation thérapeutique de l'interleukine-2 (IL-2), une cytokine capable d'activer et de faire proliférer des lymphocytes T et des cellules NK (Henney et al., 1981), la mise en évidence de lymphocytes T infiltrant les

tumeurs (appelés alors « TILs » pour Tumor-Infiltrating Lymphocytes ») et la manipulation *ex vivo* de ces lymphocytes avec l'interleukine-2 (IL-2) et des antigènes tumoraux pour générer des cellules tueuses « LAK », pour « Lymphokine-Activated Killers ») en grand nombre avant leur ré-injection chez des patients cancéreux (Rosenberg et al., 1985 ; Rosenberg et al., 1986 ; Toledano et al., 1989).

De l'hypothèse de l'immunosurveillance découle celle dite de « l'immunoediting », avancée par Robert Schreiber (Dunn et al., 2002) signifiant que des cellules tumorales mutées sont sélectionnées positivement sous la pression du système immunitaire. Cette sélection aboutit à un échappement de l'immunosurveillance puisque seules les cellules tumorales mutées échappent à l'activité anti-tumorale des cellules immunitaires. Ce système de sélection Darwinien conduirait donc à la survie des cellules tumorales les moins immunogéniques et a été théorisé par Robert Schreiber sous le nom de la théorie des « 3E » (Dunn et al., 2004): la phase d'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire, la phase d'équilibre entre la tumeur et son hôte pendant laquelle surviendrait le phénomène « d'immunoediting », et enfin la phase d'échappement tumoral où ces cellules malignes contournent les défenses anti-tumorales par divers mécanismes [perte de l'expression de molécules du Complexe majeur d'Histocompatibilité (CMH), mutations entraînant une perte d'immunogénicité, mise en place de mécanismes immunosuppresseurs ...] (Figure 1).

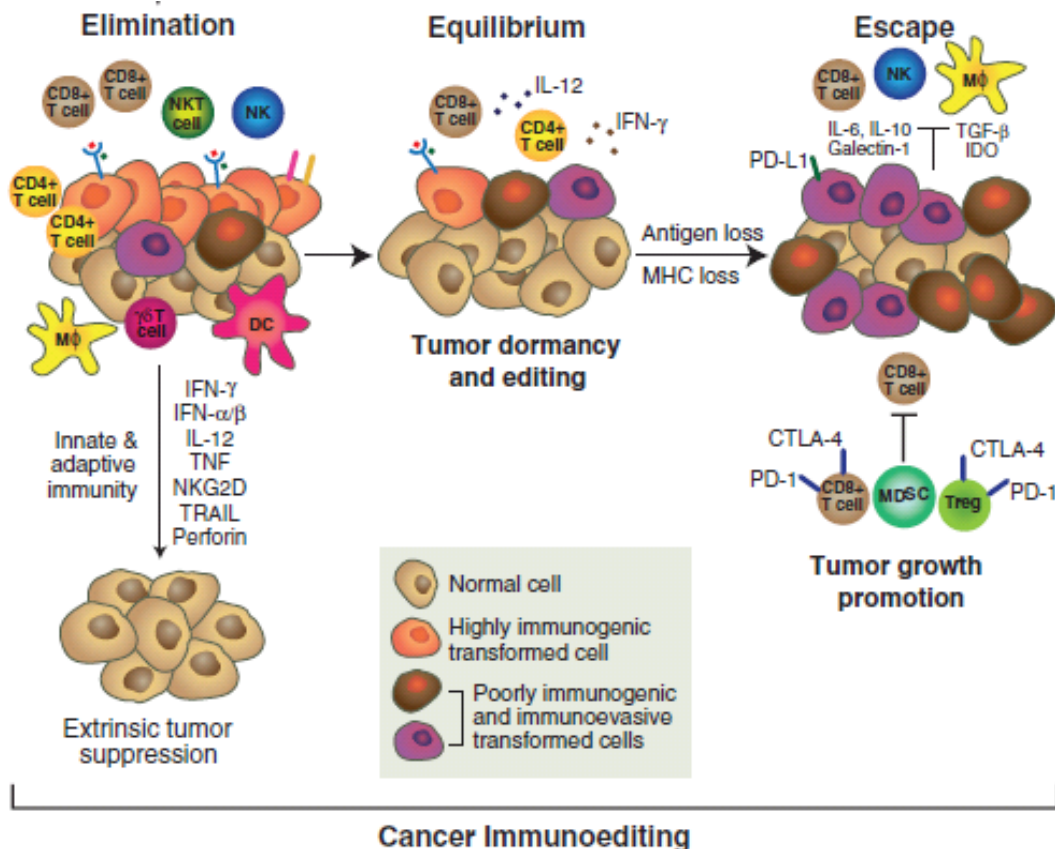


Figure 1. « Immunoediting » des tumeurs : la théorie des 3E. L'apparition de cellules malignes transformées provoque une inflammation marquée par le recrutement des cellules du système immunitaire inné (cellules NK, NKT, macrophages, cellules dendritiques (CDs), lymphocytes T $\gamma\delta$) et adaptatif (lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺), qui éliminent la majorité des cellules tumorales par des mécanismes de cytotoxicité et un contexte cytokinique anti-tumoral (IFN- α/β , IFN- γ , TNF- α ...). Les cellules tumorales survivantes entrent alors en quiescence, conduisant à un état d'équilibre avec le système immunitaire qui peut s'étaler sur plusieurs années. S'installe alors un processus de sélection Darwinienne des cellules tumorales les plus à même de résister à la réponse immunitaire anti-tumorale. Ces mécanismes d'échappement (perte de l'expression de molécules du Complexe majeur d'Histocompatibilité (CMH), mutations entraînant une perte d'immunogénicité, mise en place de mécanismes immunosuppresseurs ...) permettent à terme à la tumeur de se développer dans un contexte favorable. D'après Schreiber et al., 2011.

Cette théorie a été confortée par une étude préclinique où des tumeurs ont été induites chez des souris immunocompétentes, chez des souris dépourvues de lymphocytes (souris RAG2^{-/-}) et chez des souris dépourvues de lymphocytes, NK, NKT et lymphocytes T $\gamma\delta$ (souris RAG2^{-/-} $\gamma\delta$ ^{-/-}) et donc immunodéficientes dans les deux derniers cas (O'Sullivan et al., 2012). Les cellules tumorales issues de ces différents hôtes ont été transplantées à des souris receveuses immunocompétentes afin de comparer leur croissance tumorale. Plus l'hôte chez lequel les cellules tumorales avaient poussé était immunodéprimé, moins la tumeur résultante

transplantée s'est montrée agressive chez la souris receveuse. En clair, plus le système immunitaire de l'hôte soumet les cellules tumorales à une pression de sélection importante, plus la tumeur résultante sera à même d'échapper au contrôle de celui-ci, suggérant par cette expérience que les composantes innées et adaptatives du système immunitaires sont impliquées dans « l'immunoediting ».

ii. La phase d'élimination

1. L'immunité innée

La reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire inné dépend essentiellement de leur capacité à différencier des cellules normales de cellules tumorales. Il existe différentes caractéristiques moléculaires et cellulaires des cellules tumorales qui permettent cette reconnaissance par les cellules de l'immunité innée durant les premières phases de la tumorigenèse : surexpression de protéines membranaires atypiques (exprimées par exemple normalement lors de l'embryogenèse, comme l'antigène carcino-embryonnaire, ACE), ADN endommagé, activation et des protéines de choc thermique, contribuent à un début de réponse anti-tumorale, accompagnant la mise en place d'une inflammation liée à la tumeur.

Les cellules NK sont probablement les cellules de l'immunité innée dont l'action anti-tumorale est la mieux décrite. Ces lymphocytes utilisent de nombreux récepteurs différents codés par des gènes incapables de réarrangement. Les cellules NK co-expriment des récepteurs inhibiteurs et activateurs et leurs engagements simultanés contrôlent l'état d'activation général de la cellule. Parmi ces récepteurs, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 et NKG2D sont les plus représentés. En particulier, NKG2D a fait l'objet d'une attention toute particulière du fait de son rôle crucial dans les réponses anti-tumorales et infectieuses : ce récepteur reconnaît des protéines de la famille MIC (*MCH class I polypeptide-related sequence*), similaires aux molécules de CMH de classe I et surexprimées par des cellules ayant subi un stress ou des cellules tumorales (Raulet and Guerra, 2009).

Les macrophages reflètent la complexité et la plasticité des cellules immunitaires innées dans un interactome aussi complexe que le microenvironnement tumoral. Si les capacités des macrophages à reconnaître et détruire des cellules tumorales via des mécanismes impliquant

le TNF- α ont été démontrées depuis de nombreuses années (Aliprantis et al., 1996), la valeur pronostique de ces phagocytes infiltrant les tumeurs peut varier radicalement en fonction de leur phénotype. A l'instar des cellules NK qui peuvent devenir anergiques dans les stades les plus avancés des cancers, une majorité des macrophages purifiés à partir des tumeurs présentent un phénotype M2 tolérogène, associé à une production d'IL-10, signe des capacités immunosuppressives des cellules cancéreuses. En revanche, ce phénotype peut facilement être inversé *in vitro* vers un type M1 plutôt anti-tumoral (Biswas and Mantovani, 2010). De même, s'il peut paraître logique qu'un macrophage de type M1 exerce une activité anti-tumorale plus efficace, certaines études suggèrent le contraire ; il a été montré que les macrophages responsables de la phagocytose des complexes immuns formés entre un anticorps anti-CD20 et des cellules lymphomateuses étaient de type M2 et non pas M1 (Leidi et al., 2009). La grande diversité des signaux pouvant être perçus par les macrophages ainsi que leur plasticité rendent difficile l'analyse de leur rôle intratumoral en fonction des contextes. Enfin, les cellules dendritiques (DCs) comptent parmi les acteurs-clefs de la réponse anti-tumorale, puisqu'elles représentent les principales passerelles vers une réponse adaptative spécifique. De nombreuses sous-populations de DCs ont été identifiées et caractérisées. Ces cellules agissent en produisant de l'interféron (IFN) de type 1, premier élément d'alerte du système immunitaire dans le cadre des réponses cellulaires dirigées contre des tumeurs et des infections virales, ainsi qu'en présentant des peptides dérivés d'antigènes tumoraux, associés aux molécules de CMH de classe II et de classe I lorsqu'elles sont capables de présentation croisée (« cross-presentation »). Au-delà de ces mécanismes couramment décrits, l'étude de DCs intra-tumorales a permis de mettre en évidence, chez certains patients, l'existence de DCs tueuses capables de provoquer l'entrée en apoptose de leur cible à la suite de l'interaction de Fas qu'elles expriment avec Fas-Ligand (Larmonier et al., 2010).

2. Les TILs et la reconnaissance antigénique

L'engagement des DCs dans les réponses anti-tumorales sous-tend la présentation de peptides tumoraux issus de protéines qui ne seraient peu ou pas exprimées par les cellules normales du tissu affecté. De gros efforts ont été entrepris pour identifier l'identité moléculaire de ces antigènes, et en particulier ceux qui seraient exprimés par un grand nombre de cancers et

conservés malgré la présence de mutations (Brichard and Lejeune, 2007 ; Boon et al., 1995). L'existence de ce type d'immunité soulève plusieurs questions. D'une part, les réponses générées proviennent souvent d'une stimulation antigénique de moyenne intensité et risquent donc de donner naissance à des lymphocytes anergiques, voire tolérogènes. D'autre part, la plupart du temps, l'expression de ces protéines n'est pas strictement limitée aux cellules tumorales, ce qui engendre la possibilité d'induire une auto-immunité, délétère pour le tissu sain, limitant ainsi les possibilités d'intervention thérapeutique utilisant ce type d'approches.

Outre les cancers viro-induits qui entrent dans une catégorie particulière de par le fait que les antigènes tumoraux ne sont pas des protéines du soi, le dérèglement du génome des cellules tumorales est à l'origine de l'expression de protéines qui ne sont pas normalement exprimées dans les cellules normales correspondantes. Il existe différentes catégories d'antigènes associés aux tumeurs. La plus répandue est celle de molécules porteuses de mutations somatiques, issues du dérèglement génétique des cellules tumorales. Ont été également mises en évidence des protéines issues de l'expression de gènes normalement non exprimés dans le type cellulaire considéré ou des protéines très fortement surexprimées, du fait de duplications géniques multiples. L'apparition de ces tumeurs dans un microenvironnement immunitaire complexe peut en effet être à l'origine d'une rupture de tolérance conduisant à la reconnaissance d'antigènes spécifiques d'un tissu donné dont l'expression est normale ou augmentée (Coulie et al., 2014). L'un des meilleurs exemples est la surexpression de la protéine HER 2/neu par environ 30% des patientes atteintes de cancer du sein. De même, les cellules de mélanome surexpriment la protéine MART-1 (« melanoma antigen recognized by T cells 1 ») et les protéines codées par le gène *MAGE* (« melanoma-associated antigen »). La protéine NY-ESO-1, initialement décrite dans les cancers des testicules et dont l'expression normale est restreinte à ce tissu, a par la suite été décrite dans un grand nombre de cancers d'origines différentes (Gnjatic et al., 2006). La description de ces protéines a conduit à l'apparition de vaccins peptidiques, dont plusieurs sont en cours d'essais cliniques (Chodon et al., 2014 ; Saito et al., 2014 ; Dhodapkar et al., 2014). Enfin, la protéine MUC1 est l'exemple typique d'un antigène tumoral modifié dans sa glycosylation et surexprimé par un grand nombre de tumeurs différentes, l'expression de cette protéine étant associée au développement de carcinomes ainsi qu'avec la résistance à la chimiothérapie.

Des études menées dans de nombreux types de cancers montrent une corrélation entre la présence de lymphocytes infiltrant les tumeurs (« Tumor-Infiltrating Lymphocytes », ou TIL) et la survie des patients. Une très grande majorité de ce type d'études démontre un bénéfice

clinique apporté par la présence des lymphocytes T CD8⁺ CD45RO⁺ et Th1. Ces observations ont été à l'origine d'essais cliniques de transferts adoptifs de TILs spécifiques d'antigènes d'une tumeur donnée, dans l'espoir de rétablir la réponse immunitaire. Néanmoins, la plupart de ces essais n'ont pas eu l'effet escompté. Parmi les explications proposées pour expliquer ces résultats mitigés, l'environnement immunosuppresseur de la tumeur a été évoqué (Restifo et al., 2012) : des TILs cytotoxiques *in vitro* peuvent devenir anergiques *in vivo* et perdent leurs capacités de lyse cellulaire chez les patients.

Une alternative proposée pour contrevenir à la tolérisation des TILs est la technologie des « T-bodies » (Eshhar et al., 1993), revisitée plus récemment en l'améliorant pour obtenir des lymphocytes T artificiellement modifiés (les T « *Chimeric Antigen Receptor*, ou T CAR »). De tels lymphocytes T sont capables de lier une molécule présente à la surface des cellules tumorales dans sa conformation native (Maus et al., 2014) grâce à l'expression d'un fragment d'anticorps (« single chain Fv, scFv », fait d'un domaine VH et d'un domaine VL d'immunoglobuline reliés par un peptide espaceur hydrophile flexible). Cette fixation induit une activation des lymphocytes T ainsi modifiés via l'engagement des domaines intracellulaires fusionnés au scFv par l'intermédiaire d'un domaine transmembranaire (en général la région transmembranaire correspondant à celle de la molécule dont le domaine intracellulaire est utilisé dans la construction, celle de CD28 donnant les meilleurs résultats en terme de stabilité du scFv) et d'une région charnière très flexible (la plupart du temps, la région charnière des IgG1 humaines). Ce domaine intracellulaire des CAR est composé du domaine intracellulaire de la chaîne ζ du complexe multimoléculaire CD3 et d'un ou plusieurs domaines intracellulaires de molécules costimulatrices comme CD28, 4-1BB (CD137), ICOS (CD278), ou OX40, ce qui conduit à une cytotoxicité anti-tumorale (Figure 2). Cette approche présente différents avantages : elle confère une forte affinité aux lymphocytes T pour les cellules tumorales grâce à une interaction de type antigène-anticorps ; elle permet également de conférer les spécificités désirées aux lymphocytes T contre un large spectre d'antigènes, en plus de shunter le système classique de reconnaissance qu'utilisent les lymphocytes T (interaction du récepteur T de l'antigène (TCR) avec le complexe peptide-CMH). Essentiellement développées pour le traitement d'hémopathies malignes (leucémies et les lymphomes), les cellules actuellement étudiées reconnaissent des antigènes comme la molécule CD19. L'infusion de ces cellules chez des patients présentant différents types d'hémopathies (leucémies et lymphomes) a conduit à un bénéfice clinique associé à des

rémissions plus ou moins longues, semblant dépendre directement de la demi-vie des lymphocytes T CAR *in vivo* (Kalos et al., 2011 ; Maude et al., 2014 ; Davila et al., 2014).

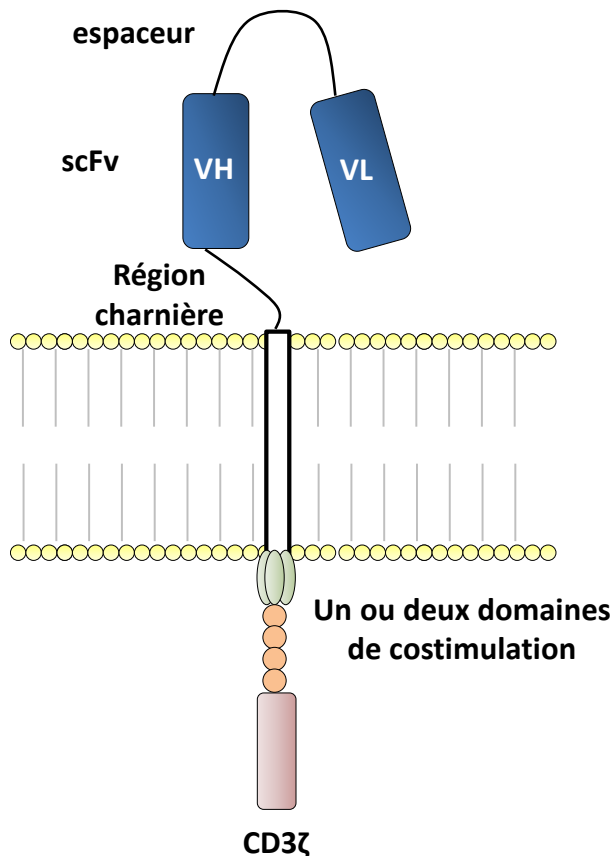


Figure 2. Structure des CAR de 2^{ème} et 3^{ème} génération. Les CAR sont constitués d'une région extracellulaire contenant les domaines VH et VL d'un anticorps, d'une région charnière, d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine intracellulaire constitué d'un ou deux domaines issus de molécules de co-stimulation et du domaine intracellulaire de la chaîne ζ du complexe multimoléculaire CD3. Adapté de Maus et al., 2014.

L'analyse détaillée des lymphocytes T présents aux sites tumoraux a également montré la présence de lymphocytes T régulateurs (Tregs). Leur présence est classiquement associée à un mauvais pronostic, comme c'est le cas pour le cancer des ovaires, du sein ou de l'estomac. En revanche, certains cancers comme celui de la tête et du cou ou les lymphomes sont positivement associés à un infiltrat de Tregs. La dichotomie d'impact de cette population peut s'expliquer par les différents modes d'action de ces cellules. Leur recrutement sur le site tumoral est généralement lié à la sécrétion de chimiokines comme CCL22, dont le ligand CCR4 est fortement exprimé par les Tregs. L'importance de ce mécanisme a été mis en

lumière par une étude pré-clinique où l'inhibition de CCR4 par une molécule antagoniste a permis à des souris porteuses du mélanome B16-ovalbumine d'améliorer significativement le nombre de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'ovalbumine (Pere et al., 2011). En 2013, des patients atteints de mélanome ont été traités par un AcM anti-CCR4, conduisant à une déplétion des Tregs exprimant ce récepteur et à une plus forte réponse immunitaire contre l'antigène tumoral NY-ESO-1 (Sugiyama et al., 2013).

Le mécanisme d'action le plus pléiotropique implique la sécrétion d'IL-10 et de Tumor Growth Factor- β (TGF- β) (Figure 3a), ces cytokines étant capables d'exercer une action immunosuppressive sur la plupart des cellules immunitaires sans nécessiter de contact cellulaire (Bergmann et al., 2007). Des Tregs ont par ailleurs été décrits comme étant capables d'exercer une lyse cellulaire dépendante de la sécrétion de granzyme B et de perforine vis-à-vis des lymphocytes T (Figure 3b) (Zhao et al., 2006). Il existe également un débat concernant une possible inhibition des TILs par les Tregs via une déprivation en d'IL-2 conduisant à un épuisement des lymphocytes effecteurs tandis que la prolifération des Tregs, qui expriment bien plus fortement le récepteur de haute affinité de l'IL-2 que les lymphocytes activés est favorisée dans cette situation (Figure 3c). Enfin, des interactions *in vivo* entre des DCs et des Tregs ont été observées ; les Tregs seraient capables de moduler l'activité des DCs, en particulier au travers de l'interaction entre CTLA4 et les molécules de co-stimulation (Figure 3d). La plasticité des Tregs reste cependant très importante et il est possible que certains des mécanismes d'action de ces cellules dans le microenvironnement tumoral ne soient pas encore élucidés. L'échec clinique de l'utilisation des anticorps anti-CD25 induisant la déplétion des cellules CD25⁺ a conduit à de nouvelles explorations de stratégies de manipulation des Tregs. L'IL-2 a par exemple été largement testée en clinique mais n'est utilisée aujourd'hui que pour le traitement des mélanomes métastatiques et des cancers du rein ; parmi les raisons de l'utilisation très limitée de cette cytokine en tant que thérapie anti-cancéreuse, il a été évoqué le fait que cette cytokine provoquait une expansion des Tregs associés à la tumeur, ces cellules exprimant fortement le récepteur de haute affinité de l'IL-2. L'IL-2 est d'ailleurs actuellement testée en clinique chez des patients atteints de diabète de type 1 après qu'il ait été démontré que des injections d'IL-2 favorisait l'expansion des Tregs et diminuait la production locale d'IFN- γ (Grinberg-Bleyer et al., 2010 ; Hartemann et al., 2013).

De même, la mise en évidence de spécificités peptidiques des Tregs intra-tumoraux remet en question l'utilisation de vaccins peptidiques qui pourraient induire l'activation des Tregs aussi bien que celle des TILs cytotoxiques.

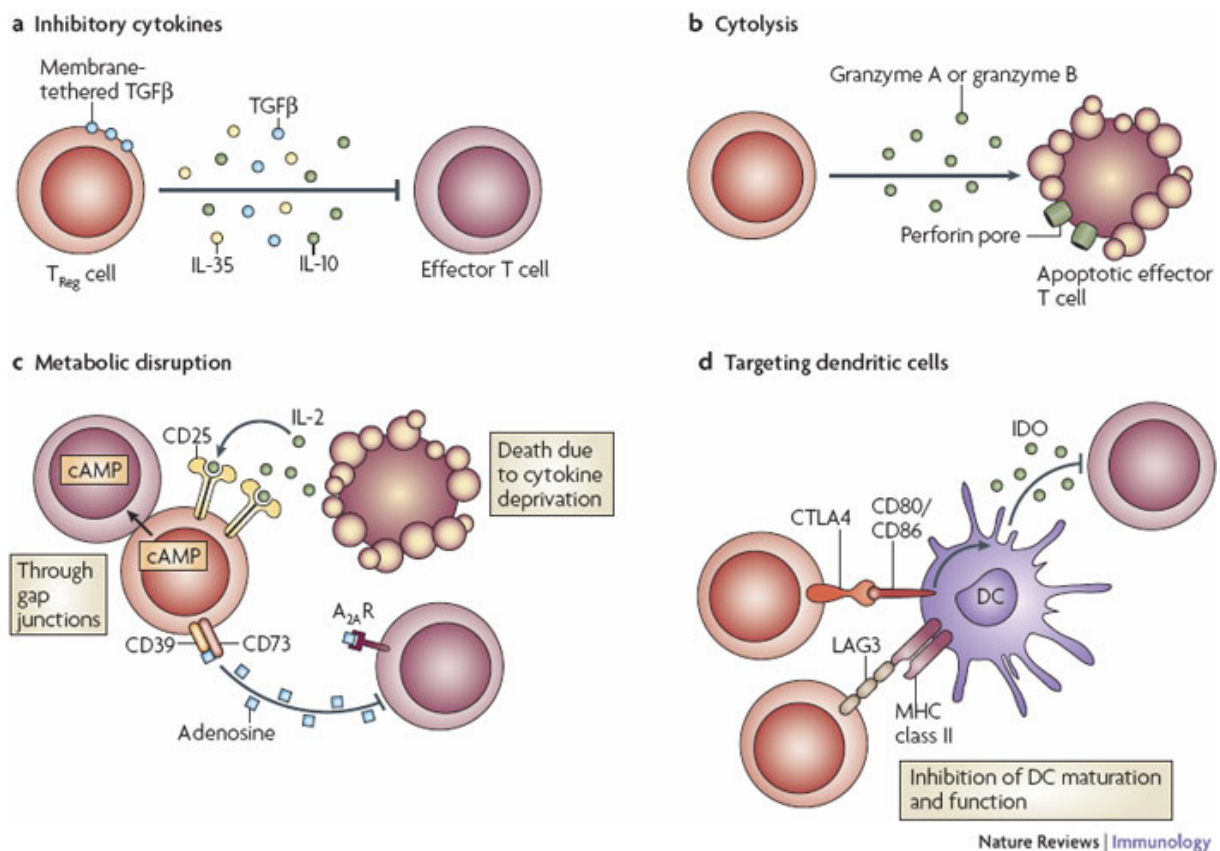


Figure 3. Mécanismes d'action des Tregs. a : Action des cytokines immunosuppressives IL-10, TGF-β et IL-35. b : Lyse cellulaire spécifique de cellules effectrices. c : Déprivation cytokinique des lymphocytes effecteurs. d : Inhibition de la maturation et de l'activité des DCs. D'après (Vignali et al., 2008).

Ainsi, malgré le potentiel thérapeutique considérable que représentent l'utilisation des TILs et des vaccins peptidiques associés, ce champ reste encore limité par des contraintes liées à un environnement immunosuppresseur, une expansion de Tregs et une anergie des TILs au site tumoral.

iii. La phase d'équilibre

La phase dite d'équilibre commence lorsque certaines cellules tumorales parviennent à survivre à la phase initiale d'élimination par les différentes populations immunitaires grâce à

leurs capacités d'adaptation. S'installe alors un état d'équilibre entre ces cellules tumorales résiduelles, résistantes aux mécanismes de reconnaissance et de cytotoxicité, et le système immunitaire de l'hôte. Celui-ci empêche alors la croissance tumorale mais par-là même sculpte l'immunogénicité des cellules tumorales. Cet « immunoediting » des tumeurs par le système immunitaire est un processus qui peut prendre plusieurs années et qui est essentiellement exercé par les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$, spécifiques des antigènes tumoraux. Cette phase est la plus complexe à démontrer expérimentalement et, souvent, seules des preuves indirectes sont apportées. Des modèles murins expérimentaux ont permis de démontrer qu'une tumeur latente, indétectable, peut ressurgir de façon très agressive après déplétion de compartiments immunitaires de l'hôte (lymphocytes $CD4$ ou $CD8$) ou par absence ou neutralisation de cytokines (comme l' $IFN-\gamma$) (Koebel et al., 2007). Chez l'Homme, des reins transplantés d'un donneur en rémission à long terme d'un mélanome ont provoqué chez les patients receveurs des cancers extrêmement agressifs. Dans ce cas précis, il a été suggéré que l'immunosuppression due aux traitements post-transplantation a engendré la rupture de l'état d'équilibre et la résurgence de cellules tumorales dormantes (Elder et al., 1997).

iv. La phase d'échappement

L'importance des mutations génétiques, caractéristiques des cellules tumorales, mène à un processus de sélection Darwinienne des clones tumoraux les plus à même d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire, conduisant directement à l'apparition d'un cancer détectable.

La baisse d'immunogénicité des cellules tumorales peut correspondre à la perte de l'expression de molécules du CMH ou de molécules de co-stimulation, ou, au contraire, l'expression de ligands inhibiteurs de la réponse immunitaire. De nombreux mécanismes participent à l'échappement tumoral et à l'établissement d'un environnement immunosuppresseur, qui peut passer par la production d'IL-10 et de $TGF-\beta$, cytokines immunosuppressives à large spectre, ou par le recrutement de cellules telles que les Tregs, les MDSC (« Myeloid-derived suppressor cells »), les macrophages de type M2 et les neutrophiles de type N2, caractérisés par leurs capacités immunosuppressives. Enfin, des adaptations moléculaires peuvent être à l'origine de l'échappement tumoral. La capacité des

cellules à modifier l'expression de certains de leurs gènes peut se traduire par l'acquisition de la capacité à effectuer une transition épithélio-mésenchymateuse se traduisant par une perte d'adhérence cellulaire, ce qui peut être considéré comme constituant la première étape de formation de métastases. Ce phénomène s'accompagne souvent de l'acquisition d'une capacité à produire du VEGF (« vascular endothelial growth factor »), qui contribue à une néo-angiogenèse et à l'acquisition d'une forte perméabilité vasculaire, favorisant ainsi la croissance tumorale et le processus de métastase de la tumeur (Goel et Mercurio, 2013).

b. Le microenvironnement tumoral

i. Infiltrats immunitaires, de bon ou mauvais pronostic ?

Depuis plusieurs années, il est acquis que la composition de l'infiltrat immunitaire d'une tumeur peut avoir un impact sur l'évolution de celle-ci et représente un puissant marqueur pronostique. La présence des cellules immunitaires des lignées myéloïdes et lymphoïdes a été décrite dans la plupart des tumeurs solides, soulevant entre autres de nombreuses questions sur l'utilisation massive de chimiothérapies et de la radiothérapie chez les patients atteints de cancers. L'impact clinique de ces différentes populations reste toujours très discuté. Au-delà de la variabilité du bénéfice clinique que ce microenvironnement peut avoir d'un type de cancer à un autre, le degré d'avancement même du cancer peut faire varier l'impact d'une population cellulaire. La présence de cellules NK et de lymphocytes T CD8⁺, par exemple, est très largement considérée comme de bon pronostic dans des tumeurs de stade I et II (Figure 4). De fait, les patients qui conservent une infiltration intra-tumorale de lymphocytes T au stade III de leur tumeur ont une probabilité de survie à 5 ans bien supérieure aux autres (Mlecnik et al., 2011). Des études menées chez des patients atteints de cancer du poumon ont démontré que les cellules NK intra-tumorales acquéraient un phénotype anergique dans les stades les plus avancés, et, perdant leur capacité sécrétrice d'IFN- γ et leur capacité cytotoxique, perdent également leur valeur pronostique (Platonova et al., 2011 ; Vivier et al., 2012). Les lymphocytes T CD8⁺ comptent parmi les cellules les plus souvent associées à un pronostic favorable. De nombreuses études démontrent notamment que la présence de lymphocytes T CD8⁺ associés à la tumeur sont de bon pronostic dans de nombreux types de cancers solides (Galon et al., 2006 ; Pagès et al., 2005 ; Mahmoud et al., 2011 ; Vermeer et

al., 2001), bien que l'origine tissulaire de la tumeur puisse être à l'origine d'un inversement de cette tendance, comme cela a été démontré dans le cancer du rein (Remark et al., 2013).

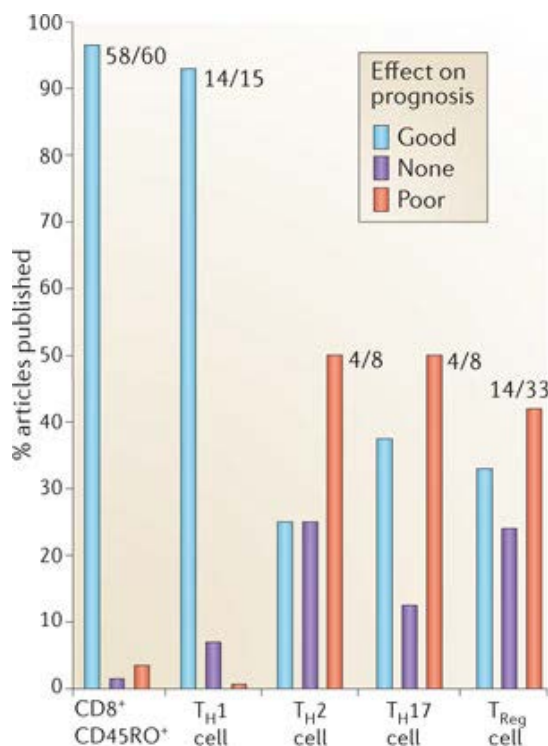


Figure 4. Méta-analyse de l'impact de différentes populations lymphocytaires T sur le pronostic de différents cancers rapporté dans les publications. D'après Fridman et al., 2012.

L'implication des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ est plus controversée. Si une signature Th1 est très largement associée à une évolution favorable (Figure 4), les résultats concernant les cellules Th2, Th17 et Tregs sont souvent contradictoires.

C'est ainsi que le rôle des Tregs est débattu dans nombre de cancers. Alors que certains travaux rapportent que la présence de Tregs intra-tumoraux est associée à un mauvais pronostic dans le cancer ovarien (Curiel et al., 2004) et dans les hépatocarcinomes (Gao et al., 2007), d'autres études menées chez des patients atteints de lymphomes folliculaires (Carreras et al., 2009a) ou de cancers colorectaux (Salama et al., 2009) montrent qu'une forte densité de Tregs dans la tumeur est associée à une survie plus longue. La controverse concerne également les Th17, et de façon générale l'inflammation au sein du microenvironnement tumoral. Un contexte inflammatoire au sein de la tumeur peut favoriser la progression

tumorale et l'apparition de métastases, en particulier du fait de l'épuisement de réponses immunitaires anti-tumorales (Zou et Restifo, 2010 ; Muranski et Restifo, 2013). A l'inverse, la libération de cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-17 peut activer le système immunitaire. Chez l'Homme, il existe autant d'études cliniques démontrant l'impact positif que négatif des Th17. La composition en cytokines du microenvironnement tumoral peut influencer l'état d'activation de nombre de cellules, à commencer par les macrophages.

Enfin, la définition de ces différentes sous-populations, avec leurs caractéristiques phénotypiques et transcriptionnelles, et avec leur spectre de production de cytokines (Figure 5), pourrait être moins définitive que ce qui a été décrit, leur plasticité étant sous-estimée. De récentes études suggèrent que l'expression de Foxp3 et ROR γ t, facteurs de transcriptions spécifiques des Tregs et des Th17 respectivement, pourrait ne pas être restreinte à ces seules populations cellulaires. Foxp3 par exemple, bien que très spécifique des Tregs chez la souris, peut être exprimé chez l'homme sur des lymphocytes activés (Miyara et al., 2009).

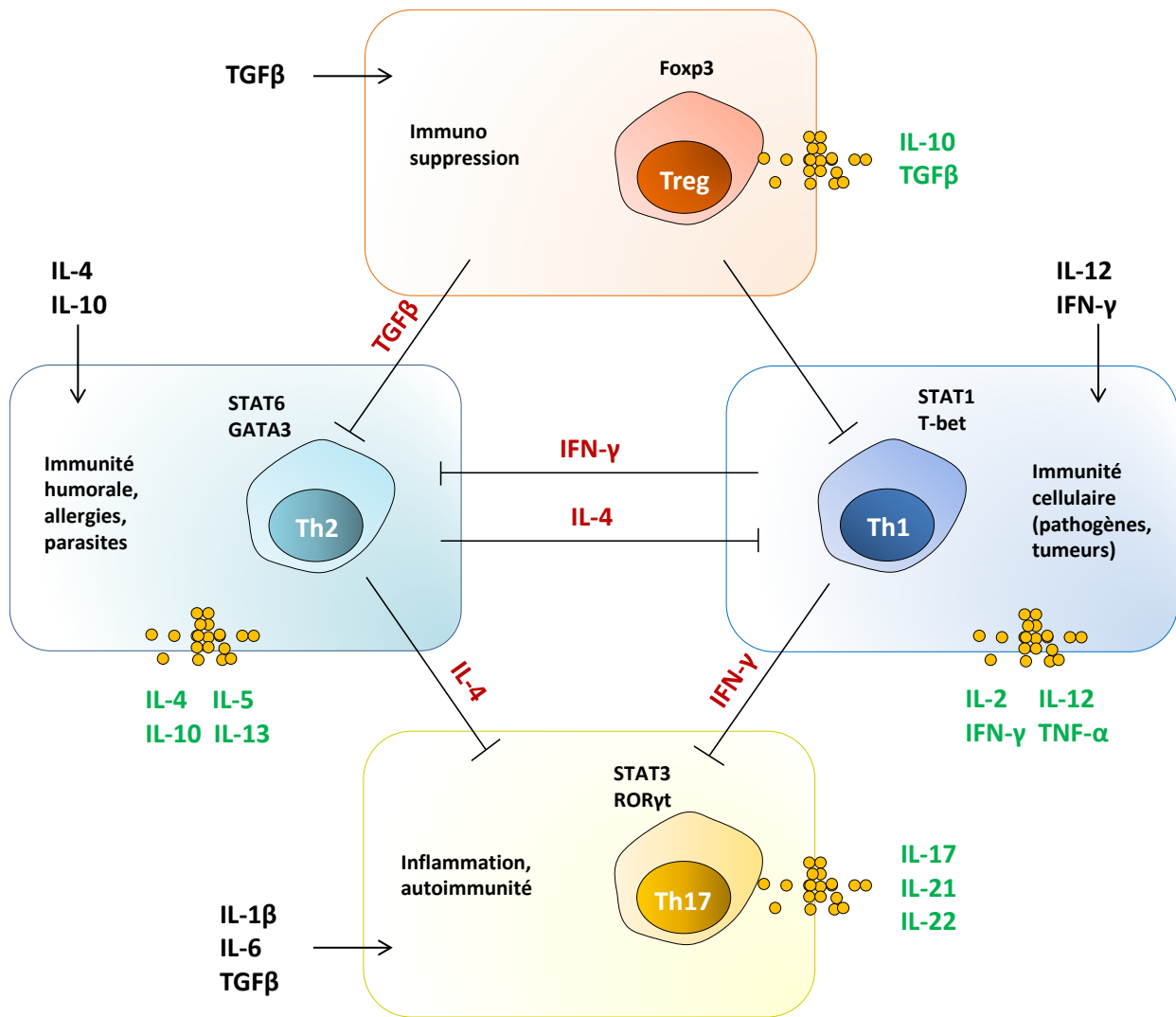


Figure 5. Les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺. Après activation par les CPA, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs se différencient en sous-populations effectrices (Th1, Th2, Th17, Treg). Chacune de ces populations possède sa signature en terme de facteurs de transcription (T-bet, GATA3, RORγt, Foxp3), de cytokines (IFN-γ, IL-4, IL-17A, TGF-β) et de fonctions immunitaires.

Le rôle des lymphocytes B infiltrant les tumeurs est également sujet à controverse. Certains travaux suggèrent qu'une réponse B peut être associée à une croissance tumorale, notamment par le biais de la production d'IL-10 et de la polarisation de macrophages de type « M2 » (Wong et al., 2010). Des études chez la souris démontrent par ailleurs que les lymphocytes B intra-tumoraux développent des réponses humorales non protectrices et sont associés à un épuisement de la réponse immunitaire adaptative (Qin et al., 1998). La sérologie de nombreux patients a cependant permis d'identifier la présence d'auto-anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux, signe que ces cellules sont capables de développer une réponse immunitaire contre

la tumeur. La présence d'organes lymphoïdes tertiaires *in situ*, décrits chez certains patients, pourrait par exemple permettre aux lymphocytes B d'être des acteurs centraux de la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale (Germain et al., 2014).

ii. Les organes lymphoïdes tertiaires

La localisation et la distribution des cellules immunitaires au sein de la tumeur varient en fonction du type de tumeur et de son organisation. Les organes lymphoïdes tertiaires (TLS) sont des agrégats immunitaires organisés liés à l'inflammation tissulaire, dont la structure est proche de celle des organes lymphoïdes secondaires. La présence de ces TLS a été rapportée dans de nombreuses pathologies caractérisées par une inflammation chronique comme les pathologies auto-immunes (Neyt et al., 2012), dont les cancers (Dieu-Nosjean et al., 2008 ; Goc et al., 2013). Ces structures non-encapsulées sont constituées de follicules B entourés de lymphocytes T et de DCs et sont associées à un bon pronostic dans le cadre du cancer du poumon, notamment (Figure 6) (Dieu-Nosjean et al., 2008). La présence et le maintien d'une néo-genèse lymphoïde à différents stades d'évolution de ces cancers sont rendus possibles par la présence d'un type particulier de vaisseaux sanguins, les HEVs (« High Endothelial Venules »), classiquement associés à un bon pronostic (Martinet et al., 2011) car liés à l'extravasation de lymphocytes circulants du sang périphérique, assurant un apport en lymphocytes T naïfs vers le site tumoral. Les TLS deviennent alors un lieu d'activation et de différenciation *in situ* de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, grâce à la présence de DCs matures présentant des peptides tumoraux.

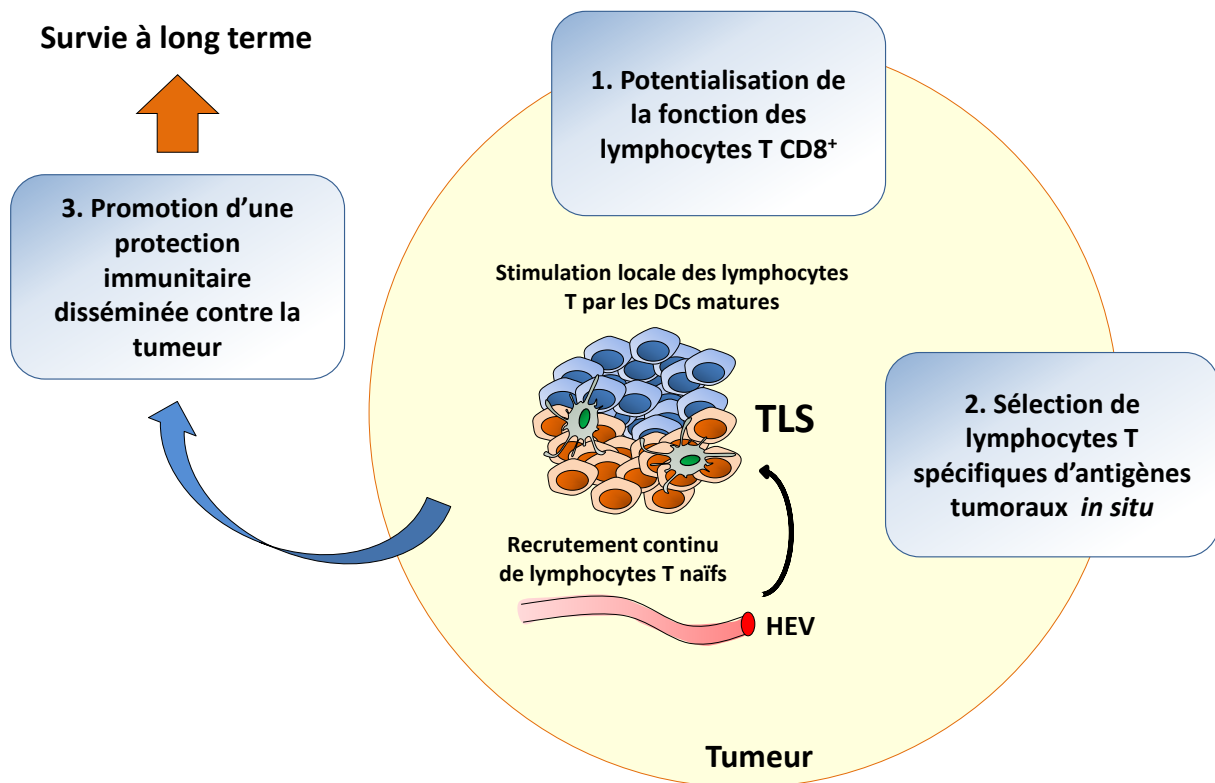


Figure 6. Impact des structures lymphoïdes tertiaires sur la réponse anti-tumorale adaptative. L'apparition de vaisseaux HEVs conduit à l'extravasation de lymphocytes et à la formation de TLS, qui promeuvent des réponses immunitaires adaptatives et favorisent une meilleure survie des patients. Adapté de Goc et al., 2013.

v. L'immuno-modulation

1. Les molécules immuno-modulatrices dans la tumeur

Récemment, l'étude de l'implication des molécules immuno-modulatrices dans le cancer a augmenté de façon exponentielle. Ces molécules, qui définissent des points de contrôle (appelés communément « checkpoints ») de la réponse immunitaire, permettent de moduler l'intensité d'une réponse immunitaire adaptative, soit parce qu'elle est trop intense (dans le cas des rejets de greffe ou de maladies auto-immunes) soit trop faible (cancers, infections chroniques). Ces molécules agissent en tant que molécules de co-signalisation en complément de l'activation du TCR ou du BCR et modulent l'activité des lymphocytes. Ces immuno-modulateurs peuvent être classés selon leur activité (inhibitrice ou stimulatrice des

lymphocytes) ou leur structure (appartenance à la superfamille des immunoglobulines ou à la superfamille des récepteurs du TNF) (Figure 7) (Page et al., 2014).

CTLA4 (« cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 ») est un homologue de la molécule de co-stimulation CD28, sauf qu'elle provoque une inhibition de l'activité du lymphocyte qui l'exprime et marque son entrée dans un état anergique (Krummel et Allison, 1995). Hautement exprimée par les Tregs, elle leur permet d'induire la tolérisation des DCs par contact cellulaire direct. PD-1 (« programmed cell death 1 ») est une molécule dont l'expression est restreinte aux lymphocytes T permettant de réguler leur activation dans les tissus (Thompson et Allison, 1997) ; ses ligands, PD-L1 et PD-L2, sont exprimés par certaines tumeurs pour échapper à l'immuno-surveillance (Yao et al., 2013). LAG-3 (« lymphocyte-activation gene 3 ») et ICOS (« Inducible T-cell costimulator ») (CD278), dont l'expression est inductible comme son nom l'indique, sont les deux autres représentants de cette superfamille de « checkpoints » inhibiteurs qui font actuellement l'objet d'une attention toute particulière pour une application thérapeutique.

A l'opposé, les molécules co-stimulatrices de la superfamille du TNF telles que CD137 (ou 4-1BB), CD40L, OX40 ou CD28 sont exprimées par les lymphocytes activés et leur engagement permet d'accroître l'activation des lymphocytes T anti-tumoraux.

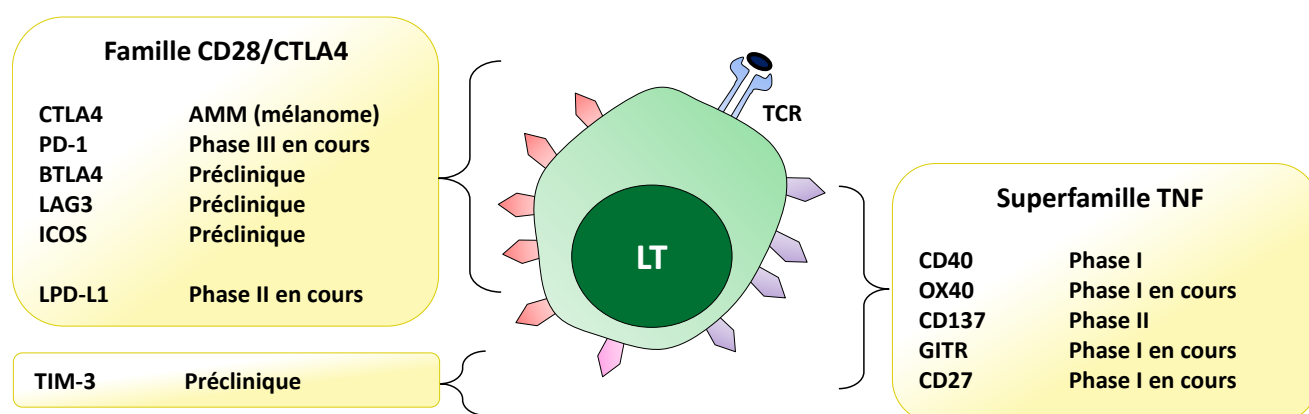


Figure 7. Molécules immuno-modulatrices du système immunitaire comme cibles thérapeutiques potentielles. Les molécules immuno-modulatrices sont exprimées à la surface des lymphocytes T, des CPA ou des cellules tumorales (PD-L1). Des anticorps agonistes ou antagonistes de ces molécules ont été développés et sont à divers stades d'essais cliniques ou d'évaluation préclinique. LT = Lymphocyte T. Adapté de Page et al., 2014.

2. Un outil thérapeutique puissant

La manipulation de ces molécules offre donc la possibilité d'un outil thérapeutique puissant afin de réorienter le système immunitaire vers une réponse anti-tumorale efficace. Dans cette perspective, des anticorps ciblant ces molécules de « checkpoints » immunitaires ont été développés ces dernières années. Le premier représentant de ces anticorps est l'ipilimumab, un antagoniste de CTLA-4. Testé chez des patients souffrant de mélanomes métastatiques, il a montré une capacité à bloquer la signalisation induite par CTLA-4 mais aussi à induire la déplétion des Tregs intra-tumoraux (Robert et al., 2011). Deux études cliniques de phase III conduites indépendamment et démontrant un bénéfice clinique de ce traitement ont été à l'origine de l'obtention, en 2011, d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) de cet AcM (Hodi et al., 2010 ; Robert et al., 2011). Ce succès a conduit à une véritable explosion d'essais cliniques utilisant des AcM dirigés contre les molécules immuno-modulatrices (Figure 7). Le nivolumab, un AcM anti-PD-1, a déjà montré des résultats prometteurs pour le traitement de mélanomes, de lymphomes de Hodgkin, et de cancers du rein, pour lesquels son efficacité clinique est actuellement évaluée en essai clinique de phase 3 (Ansell et al., 2014 ; Topalian et al., 2014 ; Motzer et al., 2014). Le pidilizumab, un autre AcM anti-PD-1, fait l'objet d'essais cliniques de phase II pour le traitement des lymphomes non-Hodgkiniens (Westin et al., 2014). Son ligand, PD-L1, fait également l'objet d'études cliniques (Brahmer et al., 2012 ; Powles et al., 2014).

L'utilisation d'AcM visant les molécules immuno-stimulatrices reste cependant en partie discutée en raison d'une importante toxicité de ce type de traitements. L'exemple historique est celui d'un essai clinique de phase I conduit en 2006 où des patients ont reçu un anticorps anti-CD28, résultant en une tempête cytokinique et une défaillance multi-organes chez tous les patients traités (Suntharalingam et al., 2006). En 2009, une étude visant à traiter des patients atteints de mélanome métastatique avec un anticorps anti-CD137, l'urelumab, a dû être interrompue à cause d'importantes toxicité hépatiques (Gangadhar et Vonderheide, 2014). Enfin, un anticorps anti-CD40 a été récemment testé pour traiter des patients atteints de lymphomes non-Hodgkiniens (Advani et al., 2009), mais les essais se sont arrêtés en phase II, faute d'activité thérapeutique (de Vos et al., 2014).

En conclusion, l'apparition de cette nouvelle classe de drogues dans le spectre thérapeutique des patients atteints de cancer est prometteuse et déjà à l'origine de plusieurs succès

thérapeutiques pour le traitement de différents types de cancers. Plusieurs défis restent néanmoins à relever, comme la limitation des toxicités liés à l'infusion de ces drogues chez les patients, et la compréhension des mécanismes immunitaires engagés à long terme. L'avenir immédiat de cette approche thérapeutique va concerner les traitements combinatoires, en association avec des chimiothérapies, de la radiothérapie et d'autres types de drogues comme les inhibiteurs de BRAF.

B. Lymphomes B et traitements par AcM

a. Les lymphomes non-Hodgkiniens

i. Epidémiologie

Les lymphomes regroupent un ensemble de pathologies à l'origine du cancer hématologique le plus fréquent chez l'homme. Ces dernières années, aux Etats-Unis, les lymphomes représentaient 19,7 cas parmi 100 000 personnes (SEER cancer Stat Fact Sheets 2011). L'incidence a fortement augmenté entre 1975 et 2000 (d'environ 3% par an), mais tend à se stabiliser depuis 2000. Cette tendance peut s'expliquer en partie grâce à l'amélioration des outils diagnostics, ainsi qu'à de nombreux cas d'immunodéficience acquise (SIDA), favorisant l'incidence des lymphomes (Boffetta, 2011). Si l'origine ethnique n'impacte pas l'incidence des lymphomes, l'origine géographique est associée au développement des lymphomes : leur prévalence est plus élevée dans les régions les plus développées du monde que dans les régions moins développées. Ces différences suggèrent que l'exposition à certains facteurs environnementaux est impliquée dans la fréquence des lymphomes chez les différentes populations. L'incidence des lymphomes est plus élevée chez les hommes que chez les femmes, et est fortement corrélée à l'âge des patients : 75% des patients diagnostiqués ont plus de 55 ans.

L'analyse des facteurs de risques génétiques et environnementaux a démontré que le risque de développer un lymphome non-Hodgkinien pouvait être plus élevé si un parent est déjà atteint de cette maladie. Des études sur de très larges cohortes de patients sont parvenues à identifier des loci à risque (Conde et al., 2010), mais aussi l'importance des phénomènes épigénétiques dans l'apparition et le maintien de mutations somatiques délétères (Loeffler et al., 2014). Il n'existe pas ou peu d'association avec l'alcoolisme, le tabagisme ou l'obésité, ainsi qu'avec des facteurs métaboliques ou endocrinologiques comme le régime et la contraception. L'exposition à certains pesticides a été corrélée avec l'apparition de lymphomes, mais le lien avec l'exposition et la catégorie de pesticides utilisés est difficile à établir, en raison du manque d'information quant à cette exposition (Agopian et al., 2009). Il en va de même pour les solvants organiques, l'association étant compliquée à faire. En revanche, l'état du système immunitaire semble avoir un impact direct sur le développement d'un lymphome. En premier lieu, des désordres immunitaires importants dus à des maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus érythémateux disséminé peuvent être à l'origine de

lymphomes. Cependant, cette incidence peut être causée aussi bien par la maladie elle-même que par ses traitements. En effet, le risque de lymphome est également plus élevé chez des patients ayant subi une transplantation d'organe, et recevant en conséquence des traitements immunosuppresseurs à l'instar des patients atteints de maladies auto-immunes (Gibson et al., 2014). En particulier, l'incidence du lymphome chez des patients ayant reçu une transplantation rénale est beaucoup plus élevée que chez la population normale (Gibson et al., 2014). Par ailleurs, plusieurs études ont montré un important risque de développer un lymphome chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), de l'ordre de 60 à 200 fois supérieures que la population normale (Carbone et al., 2014). Cette corrélation peut s'expliquer par l'immunodéficience due à la disparition des lymphocytes T CD4⁺ et par la stimulation antigénique chronique à l'origine d'un épuisement immunitaire. Le rôle du virus d'Epstein-Barr (EBV), lié à l'apparition des lymphomes Hodgkiniens, dans l'apparition des lymphomes non-hodgkiniens, est sujet à débat. L'EBV serait un des facteurs impliqués dans la perte de contrôle de la prolifération des lymphocytes B. De même, le virus de l'hépatite C ou la bactérie *Helicobacter pylori* sont plus fréquemment retrouvés chez les patients atteints de lymphome que dans la population normale.

Les lymphomes regroupent plusieurs pathologies très hétérogènes. La classification la plus récente des lymphomes est celle proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2008 (Jaffe et al., 2008). 95% des lymphomes proviennent de lymphocytes B, les 5% restant étant d'origine lymphocytaire T. Il existe deux catégories de lymphomes B : les lymphomes de Hodgkin, décrits pour la première fois par Thomas Hodgkin en 1832, sont caractérisés par la présence de cellules de Reed-Sternberg, et fortement associés au virus de l'EBV. Ces lymphomes représentent environ 10% des lymphomes B (Tableau 1). Le reste des lymphomes sous regroupés sous l'appellation de lymphomes non-Hodgkiniens, parmi lesquels on retrouve 14 types différents (Tableau 1). Le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) et le lymphome folliculaire (LF) sont les sous-types les plus fréquents, avec une incidence respective de 30-40% et 20% des lymphomes B. Il est important de noter que les DLBCL sont des pathologies très hétérogènes, en particulier en matière de réponse aux traitements. L'expression de marqueurs moléculaires a permis de distinguer deux types de DLBCL en fonction de l'état de différenciation des lymphocytes B tumoraux : les « Germinal Centre B-like », exprimant des marqueurs caractéristiques des CG, et les « activated-B-like », exprimant des marqueurs similaires à ceux de lymphocytes B périphériques activés (Alizadeh

et al., 2000), ces derniers ayant un pronostic significativement moins bon que celui des « Germinal Centre B-like ».

Tableau 1. Sous-types de lymphomes B chez l'Homme, incidence et origine tissulaire.

Lymphome	Fréquence (%)	Origine cellulaire proposée
Leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B)	7	Lymphocytes B mémoires ? Lymphocytes B naïfs ? Lymphocytes B de la zone marginale ?
Lymphome du manteau	5	Lymphocytes B du manteau CD5 ⁺
Leucémie pro-lymphocytaire B	<1	Lymphocytes B mémoires
Lymphome folliculaire	20	Lymphocytes B du CG
Leucémie à tricholeucocytes	<1	Lymphocytes B mémoires
Lymphome de la zone marginale du MALT*	7	Lymphocytes B de la zone marginale
Lymphome nodulaire de la zone marginale	2	Lymphocytes B de la zone marginale ? Lymphocytes B monocytoides ?
Lymphome splénique de la zone marginale	1	Sous-population de lymphocytes B naïfs partiellement différenciés en lymphocytes B de la zone marginale?
Lymphome de Burkitt	2	Lymphocytes B du CG
Lymphome B diffus à grandes cellules	30-40	Lymphocytes B du CG ou post-CG
Lymphome du médiastin	2	Lymphocytes B thymiques
Lymphome post-transplantation	<1	Lymphocytes B du CG
Lymphome primaire des séreuses	<0,5	Lymphocytes B du CG ou post-CG
Lymphome plasmocytaire	1	Lymphocytes B du CG ou post-CG
Myélome multiple	10	Plasmocytes

Lymphome de Hodgkin nodulaire à
prédominance lymphocytaire

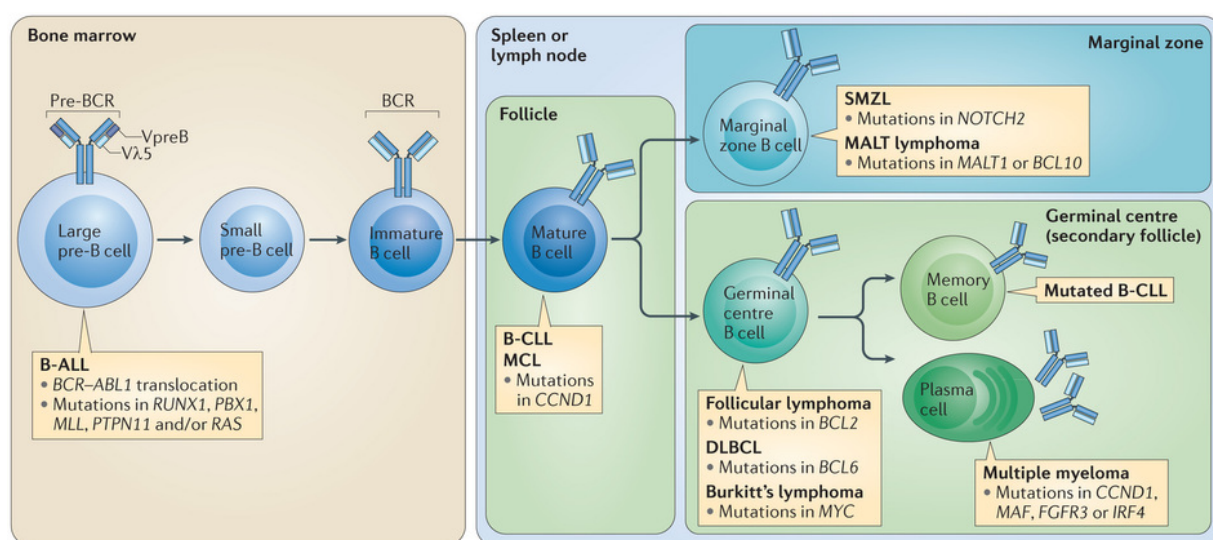
0,5

Lymphocytes B du CG

* MALT = Mucosis Associated Lymphoid tissu. CG = Centre germinatif (adapté de Küppers, 2005).

ii. Pathogenèse et physiopathologie

La grande hétérogénéité de répartition entre les lymphomes d'origine B et T peut s'expliquer de différentes façons. Les lymphocytes B se développent dans la moelle osseuse. Les cellules équipées d'un récepteur B de l'antigène (BCR) fonctionnel quittent la moelle osseuse et circulent jusqu'à rencontrer un antigène liant leur BCR. Dans le cas des réponses T-dépendantes, l'étape d'expansion clonale se déroule au sein des centres germinatifs (CG). Des événements moléculaires, l'hypermutation somatique et la commutation isotypique, qui sont l'apanage des lymphocytes B, peuvent être à l'origine de modifications génétiques délétères à l'origine de lymphomes, les cellules des différents types de lymphomes étant bloquées à un stade donné de leur développement.



Nature Reviews | Immunology

Figure 8. Origine cellulaire des différentes formes de lymphomes non-Hodgkiniens. La plupart des lymphomes ont pour origine des cellules du centre germinatif, soulignant l'importance des transformations génétiques s'y déroulant dans la physiopathologie des lymphomes. D'après Rickert, 2013.

De nombreuses études ont permis de comprendre les événements génétiques à l'origine des transformations malignes de lymphocytes B. Parmi les signatures de beaucoup de lymphomes B, des translocations chromosomiques réciproques impliquant des proto-oncogènes tels que *MYC*, *BCL2* (des molécules anti-apoptotiques) ou *BCL6* ont été identifiées. Les translocations peuvent conduire à l'apparition d'un proto-oncogène sous le contrôle d'un locus d'immunoglobuline (Ig), qui sera alors exprimé constitutivement, menant à l'immortalisation de la cellule. En particulier, les réarrangements *BCL2*-IgH et *MYC*-IgH sont respectivement associées aux LF et aux DLBCL. Dans les LF, une région du gène *BCL2* acquiert une structure altérée qui est reconnue par les nucléases RAG. Un réarrangement des gènes *MYC*, *BCL2* ou *BCL6* est en effet généralement associé à un mauvais pronostic dans le DLBCL (Ott et al., 2013).

Le fait que la plupart des lymphomes aient pour origine des lymphocytes B du CG ou post-CG (Figure 8), qui subissent des recombinaisons génétiques, souligne l'importance de ces étapes dans la genèse des cellules tumorales. En effet, les processus de recombinaison VDJ, d'hypermutation somatique et de commutation de classe seraient des événements clefs dans l'apparition d'anomalies génétiques à l'origine de ces lymphomes B.

L'expression d'un BCR fonctionnel et ne reconnaissant pas des antigènes du soi est une condition *sine qua non* à la survie des lymphocytes B. Des expériences ont par exemple démontré que l'ablation du BCR d'un lymphocyte B conduisait à son apoptose (Lam et al., 1997). Dans les LF, les DLBCL et les lymphomes de Burkitt, le maintien de l'expression des IgM de surface suggère que ces différents lymphomes sont issus des CG. Il existe par ailleurs des preuves d'un biais d'expression de certains domaines variables du BCR qui confèreraient une poly-réactivité aux chaînes lourdes (Rickert, 2013). La réactivité des lymphocytes B tumoraux peut être spécifique d'antigènes du soi ou du non-soi (antigènes viraux et bactériens). Etant donné le rôle pivot du BCR dans la biologie des lymphocytes B tumoraux, plusieurs approches thérapeutiques ont été développées ces dernières années afin d'inhiber sa signalisation. Ainsi, les inhibiteurs de PI3K δ et de Syk (fostamatinib) sont actuellement évalués dans des essais cliniques de phase I et II dans le traitement de lymphomes non-Hodgkiniens et un inhibiteur de BTK (Bruton's tyrosine kinase), l'ibrutinib, a déjà obtenu une AMM pour le traitement des lymphomes du manteau et des leucémies lymphoïdes chroniques (LLC-B). Ces molécules sont impliquées dans le maintien de l'expression du BCR et/ou la signalisation consécutive à un engagement du BCR, impliquée dans la progression des lymphomes (Fruchon et al., 2012). Par ailleurs, il a été observé une sélection des

lymphocytes B exprimant des domaines variables d'Ig contenant des motifs de N-Glycosylation dans les LLC-B. Les modifications de ces carbohydrates pourraient permettre une agrégation des BCR et ainsi fournir une signalisation suffisante en l'absence d'antigène. Enfin, des études récentes suggèrent un rôle des micro-ARN (miR) dans la pathogenèse et le développement des lymphomes B. Plusieurs miR sont surexprimés dans les cellules de la plupart des lymphomes non-Hodgkiniens et sont liés à une signature des cellules tumorales particulière, certains de ces miR prédisant même un impact sur la survie des patients (Lisio et al., 2012).

b. Traitement des lymphomes non-Hodgkiniens

i. Historique

L'histoire des anticorps monoclonaux (AcM) trouve son origine en 1975, avec le travail pionnier de Georges Köhler et de César Milstein, lorsqu'ils mettent au point la production d'anticorps monoclonaux (Köhler et Milstein, 1975). Dès la fin des années 70, cette technique est appliquée au champ de l'oncologie ; en 1982, Ronald Levy et son équipe traitent un patient atteint d'un lymphome avec un AcM dirigé contre les domaines variables de l'immunoglobuline présente à la surface des cellules de son lymphome (AcM anti-idiotype). Cependant, face aux difficultés pour développer industriellement ce type de traitement puisqu'il s'agit d'un traitement individuel lié à l'expression d'idiotopes non (ou très peu) partagés entre patients, il a alors fallu se tourner vers des cibles thérapeutiques moins variables d'un patient à l'autre. Deux ans plus tôt, en 1980, une équipe avait administré à un patient atteint de lymphome un AcM de spécificité inconnue, démontrant une efficacité prometteuse (Nadler et al., 1980) (Figure 9). La même année, la molécule CD20, un des premiers antigènes de surface des lymphocytes B hors Ig était découverte (Figure 9). Les AcM étaient jusque-là principalement produits chez la souris et les premiers essais cliniques avaient montré le développement d'anticorps humains anti-anticorps de souris (« Human Anti-Mouse Antibodies, HAMA ») conduisant à la neutralisation de l'AcM. De plus, l'utilisation d'anticorps de souris chez l'Homme présente l'inconvénient d'une fixation de leur région Fc plus faible aux récepteurs pour la région Fc des IgG (RFc γ) humains que les anticorps humains et donc une moindre mobilisation des mécanismes effecteurs du système immunitaire des patients. Des avancées dans les technologies d'ADN recombinant ont permis

dans les années qui ont suivi de développer les premiers AcM chimériques, où les domaines variables VH et VL de l'anticorps de souris se trouvent fusionnés aux domaines constants d'une IgG humaine (Morrison et al., 1984). Ces avancées ont conduit au développement d'un AcM chimérique anti-CD20 à partir d'un anticorps de souris anti-CD20 (2B8), le rituximab (Reff et al., 1994). Après plusieurs essais cliniques concluants chez des patients atteints de lymphomes B, il deviendra le premier AcM à obtenir une AMM pour traiter un cancer en 1997 (Tableau 2). Plusieurs autres AcM anti-CD20 ont obtenu beaucoup plus récemment une AMM pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique B (Tableau 2) : l'ofatumumab en 2009 et l'obinutuzumab en 2013.

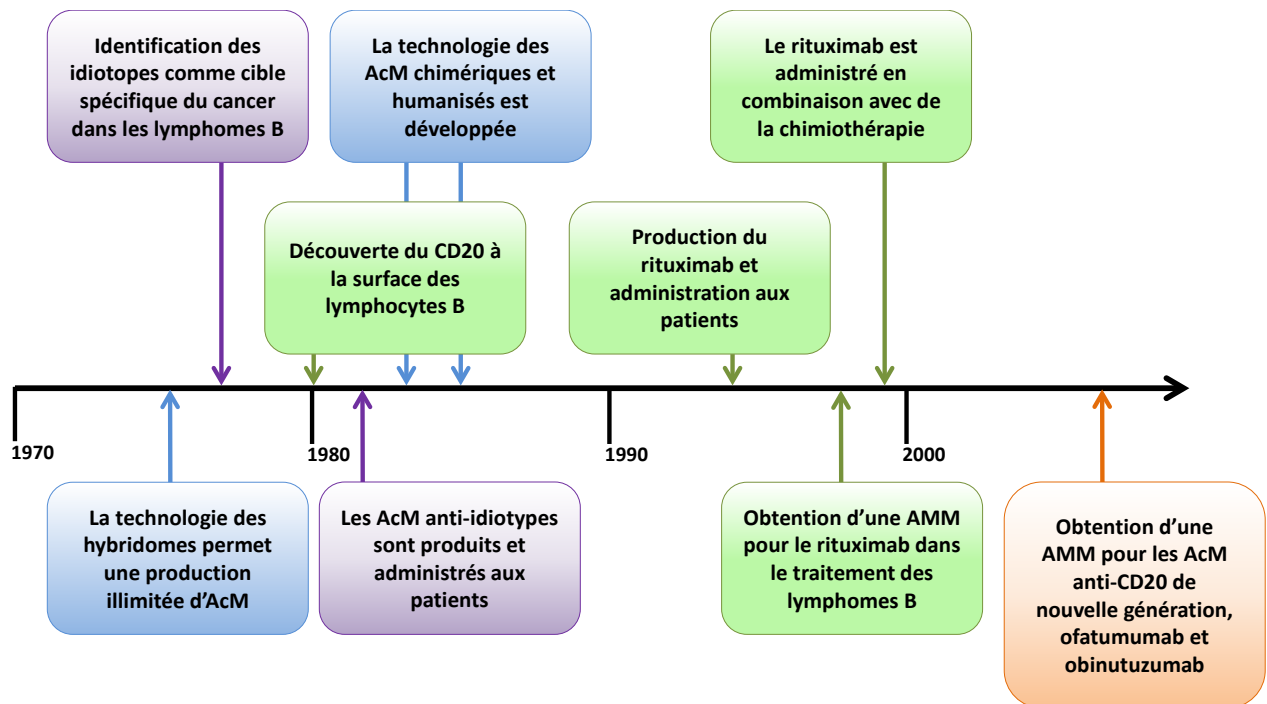


Figure 9. Histoire du développement des traitements thérapeutiques par AcM anti-CD20. Adapté de Lim H. et Levy R, J. Immunol., 2014.

Tableau 2. Liste des AcM à usage thérapeutique en oncologie (Janvier 2015).

Nom générique	Espèces / isotype	Date d'AMM	Cible	Indication
Edrécolomab	Souris (IgG2a, κ)	1995 ^e (All.) ^f	EpCAM	CRC ^c
Rituximab	Chimérique (IgG1, κ)	1997	CD20	LNH ^c
Trastuzumab	Humanisé (IgG1, κ)	1998	HER2/neu	Cancer du sein métastatique HER2 ⁺
Gemtuzumab	Humanisé (IgG4, κ) ^d	2000 ^e	CD33	LAM ^c
Alemtuzumab	Humanisé (IgG1, κ)	2001	CD52	LLC ^c
Ibritumomab tiuxetan	Souris (IgG1, κ) (couplé à : Ind ¹¹¹ /Y ⁹⁹)	2002	CD20	LNH ^c
Tositumomab-I ¹³¹	Souris (IgG2a, κ)	2003	CD20	LNH ^c
I ¹³¹ -Vivatumoxin/ I ¹³¹ -chTNT	Chimérique, IgG	2003 (RPC)	NT Ag ^g	Cancer du poumon
Cétuximab	Chimérique (IgG1, κ)	2004	EGF-R	Cancer tête et cou
Bévacizumab	Humanisé (IgG1, κ)	2004	VEGF-A	CRC ^c
Métuximab (I ¹³¹ -Licartin)	Chimérique (Fab') ₂	2005 (RPC)	CD147	HPC ^c
Nimotuzumab	Humanisé (IgG1, κ)	2005 ^h (Singapour, Inde, Cuba)	EGF-R	Cancer tête et cou, nasopharyngé, gliome
Panitimumab	Humain (IgG2, κ)	2006	EGF-R	CRC
Catumaxomab	Souris IgG2a/rat IgG2b ⁱ	2009	EpCAM/ CD3	Ascites malignes
Ofatumumab	Humain (IgG1, κ)	2009	CD20	LLC
Dénosumab	Humain (IgG2, κ)	2010	RANK-L	Métastases osseuses
Ipilimumab	Humain (IgG1, κ)	2011	CTLA-4	Mélanome
Brentuximab vedotin	Chimérique (IgG1, κ) ^j	2011	CD30	LH, ALCL ^c
Pertuzumab	Humanisé (IgG1, κ)	2012	HER2/neu	Cancer du sein métastatique HER2 ⁺
Mogamulizumab	Humanisé (IgG1, κ)	2012 (Japon)	CCR4	LTA ^c
Trastuzumab emtansine	Humanisé (IgG1, κ) ^k	2013	HER2/neu	Cancer du sein métastatique HER2 ⁺
Obinutuzumab	Humanisé (IgG1, κ)	2013	CD20	LLC
Ramucirumab	Humain (IgG1, κ)	2014	VEGF-R2	Cancers de

				l'estomac ou adenocarcinomes oesophagiens métastatiques
Pembrolizumab	Humanisé (IgG4, κ)	2014	PD-1	Mélanome métastatique
Nivolumab	Humain (IgG4, κ)	2014	PD-1	Mélanome métastatique

a Année du premier enregistrement (EMA, FDA or SFDA). EMA, *European Medicines Agency* (ex-EMEA) (EUR); FDA, *Food and Drug Administration* (E.-U.); SFDA: *State Food and Drug Administration* (RPC).

b Indication initiale (à l'exception du dénosumab dont la première indication était l'ostéoporose post-ménopause).

c ALCL, Lymphome anaplasique à grandes cellules; LTA, Leucémie T de l'adulte/lymphome; CRC, Cancer colorectal; HPC, Hépatocarcinome ; AML, Leucémie aiguë myéloïde ; LH, Lymphome Hodgkinien ; LLC, Leucémie lymphoïde chronique; LNH, Lymphome non-Hodgkinien.

d Immunoconjugué couplé à l'ozogamycine.

e Retiré du marché (édrecolomab: retiré du marché après deux essais de phase III n'ayant montré aucun bénéfice ; gemtuzumab: retiré du marché à cause d'un rapport bénéfice/risque défavorable).

f All: République Fédérale d'Allemagne ; RPC: République Populaire de Chine.

g NT Ag: *necrotic tumor antigen* ; TNT: *tumor necrotic therapy*.

h Statut de médicament orphelin accordé par la FDA et l'EMA pour le traitement des gliomes et par l'EMA pour le traitement du cancer du pancréas.

i Quadrome: Anticorps bi-spécifique obtenu par fusion de deux hybridomes.

j Immunoconjugué couplé au monométhyl auristatin E (MMAE).

k Immunoconjugué couplé au DM1 maytansinoid (T-DM1).

ii. La molécule CD20 et les anticorps anti-CD20

CD20 est une molécule oligomérique de 33-35 kDa codée par le gène *MS4A1* (*membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1*) situé en position 11q12 chez l'Homme. Cette molécule possède quatre domaines transmembranaires et une boucle extracellulaire de 43 acides aminés, aux extrémités C- et N-terminales intra-cytoplasmiques. Il existe 73% d'homologie de séquence entre la molécule CD20 humaine et son équivalent murin. La molécule CD20 est spécifiquement exprimée à la surface des lymphocytes B depuis le stade de développement pro-B tardif jusqu'au stade de lymphocytes B mémoires et dans la plupart des lymphomes non-hodgkiniens. Son expression est perdue lors de la différenciation en plasmocytes. Cette molécule, qui n'a pas de ligand connu, est un canal calcique transmembranaire impliqué dans l'activation des lymphocytes B et dans la transmission de signaux de prolifération (Avivi et al., 2013). Plusieurs études ont démontré que le blocage de l'expression de CD20 à la surface des lymphocytes B n'est pas associé à un effet délétère, que

ce soit au cours du développement de la cellule B ou lors de la mise en place d'une réponse immunitaire (O'Keefe et al., 1998), (Uchida et al., 2004). De plus, en absence de tout traitement, l'expression de CD20 à la surface cellulaire est stable dans les lymphocytes B normaux comme tumoraux (à l'exception des LLC-B où du CD20 soluble a été détecté (Manshouri et al., 2003)). Toutes ces propriétés ont fait de la molécule CD20 un bon candidat pour le développement de thérapies ciblées contre les lymphomes B non-Hodgkiniens.

Le premier anticorps anti-CD20 à avoir été développé est le rituximab. Cet anticorps chimérique contient les domaines constants d'IgG1 humaine en ce qui concerne la chaîne lourde, un domaine constant humain C κ , et des domaines variables V H et V κ de souris ; son injection conduit à la déplétion des lymphocytes B endogènes et tumoraux. Cet AcM a obtenu une AMM en 1997 pour le traitement des lymphomes non-Hodgkiniens (Figure 9). Le rituximab est administré en combinaison avec une chimiothérapie CHOP (cyclophosphamide-vincristine-doxorubicine-prednisone) et permet l'amélioration de la survie des patients atteints de différentes formes de lymphome non-Hodgkiniens. Les résistances au traitement et les limites de son efficacité ont néanmoins conduit au besoin de développer d'autres AcM à visée thérapeutique. En particulier, les réponses cliniques au rituximab des patients atteints de LLC-B sont très limitées du fait du faible niveau d'expression de CD20 sur les cellules tumorales B dans cette hémopathie maligne (Cheson, 2010). En 2004, la compagnie néerlandaise Genmab, en collaboration avec l'équipe du Prof. Martin Glennie (Université de Southampton, R.-U.) a généré un anticorps anti-CD20 humain d'isotype IgG1 et reconnaissant un épitope CD20 le classant dans les AcM anti-CD20 dits de type I (Teeling et al., 2004). Les anticorps dits de type I favorisent la mort de la cellule cible par des mécanismes effecteurs de l'immunité (ADCC, CDC) ; à l'inverse, les anticorps anti-CD20 dits de type II (qui se lient à un autre groupe d'épitopes) sont capables d'induire plus efficacement l'apoptose directe de la cellule cible.

L'ofatumumab lie un épitope du CD20 différent de celui du rituximab ; alors que celui du rituximab est situé dans la partie C-terminale de la grande boucle extracellulaire, celui de l'ofatumumab comprend la petite boucle extracellulaire, ainsi que la partie N-terminale de la grande boucle extracellulaire (Figure 10). En résulte, du fait d'un *K_{off}* bas, une meilleure affinité de l'ofatumumab pour CD20 que le rituximab, ce qui se traduit par une capacité de déplétion par CDC des cellules de LLC qui expriment faiblement CD20, que le rituximab n'a pas. Cet AcM a d'ailleurs reçu une AMM en 2009 pour le traitement de la LLC.

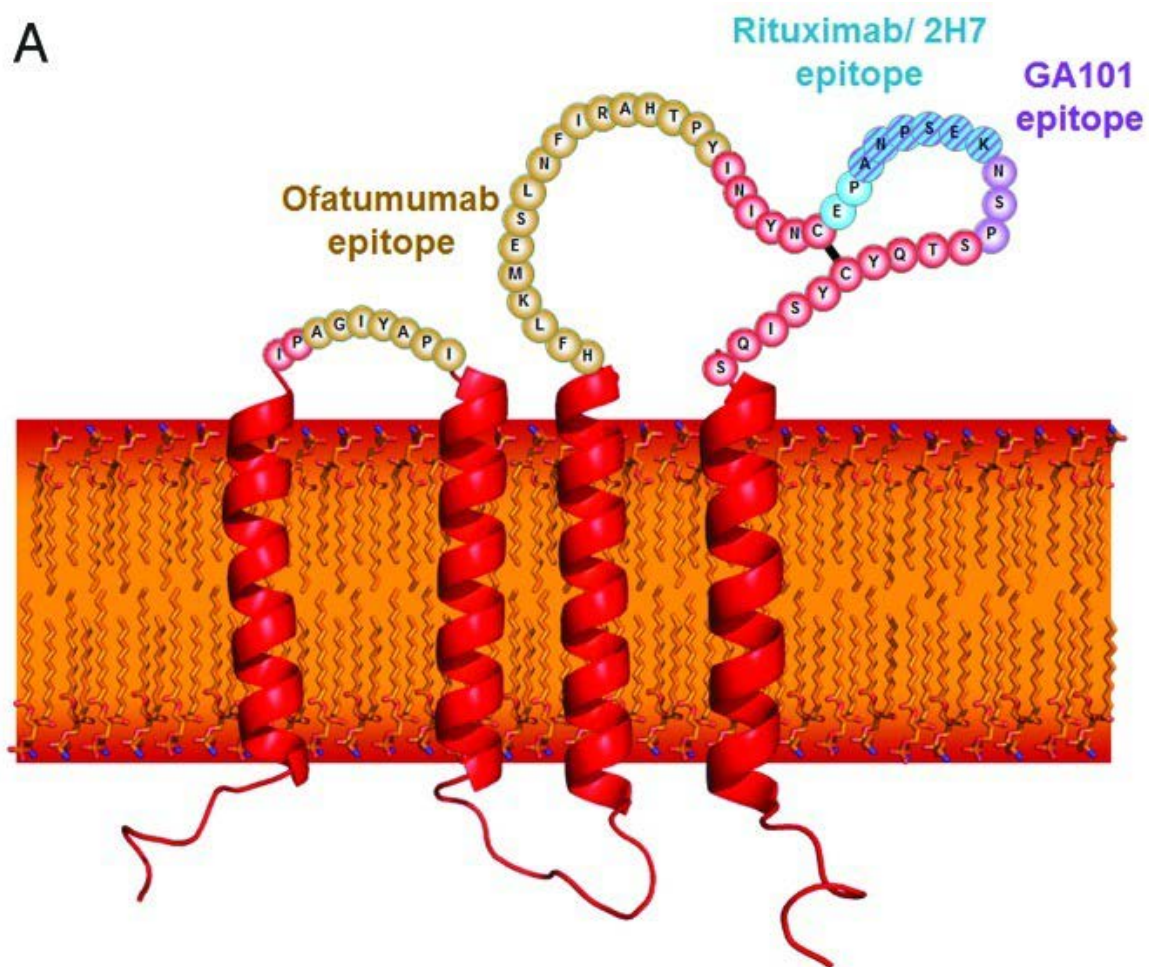


Figure 10 : Représentation de la molécule CD20 humaine et des domaines de fixation du rituximab, de l'ofatumumab et de l'obinutuzumab (GA101). D'après Klein et al., 2013.

Plus récemment, l'ingénierie des anticorps a permis la mise au point d'un anticorps humanisé présentant une glycosylation modifiée dans la région Fc (Mössner et al., 2010). Cet anticorps n'a plus de fucose associé à la première N-acétylglucosamine (GlcNAc) du carbohydrate fixé à l'asparagine en position 297, ce qui augmente l'affinité de la région Fc pour le récepteur RFcγIIIa activateur (CD16a), exprimé par les cellules NK, la plupart des monocytes, les cellules de Kupffer, les macrophages et les DCs. L'engagement de ce récepteur induit l'ADCC, ainsi que la production de cytokines comme l'IFN- γ et le TNF- α . Le RFcγIIIa est également capable d'endocyter les complexes immuns contenant des IgG. Ainsi, cet AcM est capable d'engager plus efficacement une ADCC que le rituximab (Golay et al., 2013), mais

aussi d'induire une apoptose des cellules tumorales. En 2013, l'obinutuzumab a obtenu une AMM pour le traitement de la LLC (Goede et al., 2014). En revanche, l'avantage clinique de l'ofatumumab et de l'obinutuzumab par rapport au rituximab dans le cadre des lymphomes non-Hodgkiniens est plus difficile à établir malgré la multiplication des essais cliniques. Pour l'instant, aucun de ces deux traitements n'est préféré à celui du rituximab (Sehn et al., 2011). Un autre anticorps anti-CD20, l'ublituximab, a été développé par le Laboratoire Français du Fractionnement des Biotechnologies (LFB, Les Ulis) en étroite collaboration avec notre laboratoire avant mon arrivée. Cet anticorps est un anticorps chimérique de type I, de forte affinité, dérivé de l'AcM de souris CAT-13 (IgG2a, κ) utilisé dans notre travail, et a été sélectionné pour sa capacité à exercer une forte ADCC *in vitro* dans des conditions de compétition avec de fortes doses d'IgG humaines à usage clinique (IVIg, pour « Intravenous immunoglobulin ») du fait d'une faible fucosylation lorsqu'il est produit dans les cellules de la lignée de myélome de rat YB2/0 (de Romeuf et al., 2008). Cet anticorps est actuellement testé dans des essais cliniques de Phase I/II aux E.-U. par la compagnie TG Therapeutics, Inc. (New York, E.-U.) chez des patients atteints de lymphome, en combinaison avec un inhibiteur de la PI3K δ (www.tgtherapeutics.com).

iii. AcM anti-CD20 : modes d'action

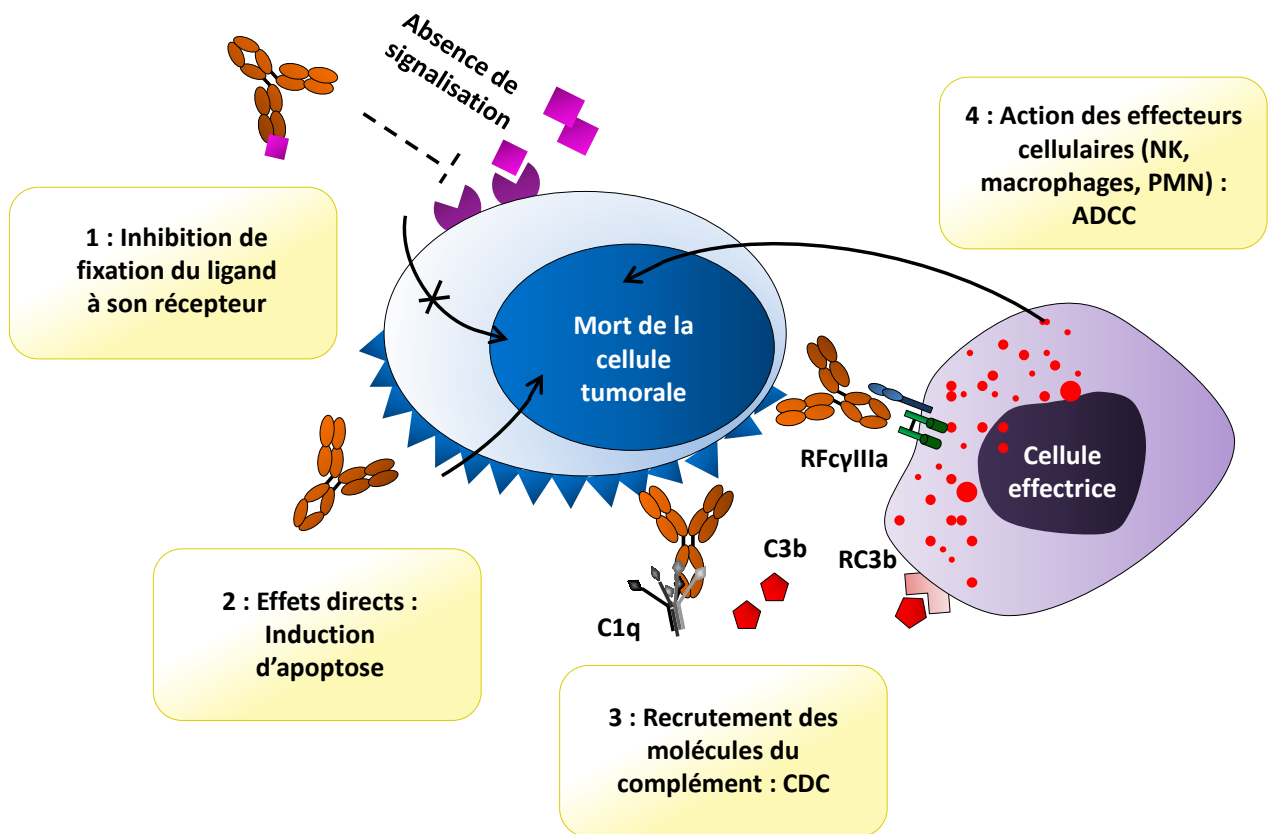


Figure 11. Mécanismes d'action des AcM thérapeutiques en oncologie. 1 : Certains AcM fixent un ligand soluble ou un récepteur cellulaire, empêchant l'interaction ligand-récepteur et donc toute signalisation intracellulaire subséquente. 2 : Certains AcM ont été décrits comme capables d'induire l'entrée en apoptose de leur cellule cible par fixation à leur cible cellulaire, indépendante des caspases. 3 : La fixation d'un AcM à sa cible cellulaire peut, selon le type d'anticorps, conduire à la fixation du premier composant de la voie classique du complément, le C1q, puis à l'activation de cette voie, conduisant à la formation d'un complexe d'attaque membranaire et à la lyse de la cellule. 4 : La fixation d'un AcM à sa cellule cible peut également, selon le type d'anticorps et son isotype, recruter les cellules effectrices de l'immunité innée (macrophage, cellules NK, neutrophiles...) exprimant des RFcy. La fixation de la région Fc des anticorps à ces RFcy peut conduire à la destruction de la cellule cible par phagocytose (macrophages) ou par cytotoxicité (cellules NK, neutrophiles). (cf Annexes I et II).

1. La cytotoxicité dépendante du complément (CDC)

L'activation du complément peut se dérouler selon 3 voies : l'activation classique, alterne, et la voie des lectines, différant selon les molécules impliquées aux premiers stades de l'activation. Toutes conduisent à la formation des convertases C3 et C5, à l'origine de la

formation du complexe d'attaque membranaire (CAM), responsable de la lyse de la cellule cible, mais aussi au recrutement d'effecteurs cellulaires. L'implication du complément au cours de la réponse immunitaire anti-tumorale est décrite depuis plus de 30 ans, et de nombreuses études ont démontré que la seule présence de cellules tumorales pouvait être à l'origine de l'activation des voies du complément. En effet, des modifications des motifs de glycosylation, des phospholipides ou de la peroxydation des lipides (Cejas et al., 2004), (Chandrasekaran et al., 2006) peuvent être suffisants pour activer le complément. Le traitement par un AcM anti-CD20 active la voie classique du complément à la suite de la fixation du C1q sur la région Fc (Figure 11) (Di Gaetano et al., 2003 ; Wang et Weiner, 2008). Des études *in vitro* ont démontré que les AcM de type I comme l'ofatumumab, ayant un *K_{off}* bas stabilisent la molécule CD20 dans les radeaux lipidiques de la membrane cellulaire, augmentant la fixation du C1q, favorisant ainsi la déplétion de la cellule ciblée par l'anticorps grâce à une forte CDC (Teeling et al., 2004).

2. La cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC)

Les RFcγ sont une classe de récepteurs appartenant à la même famille. Ils sont constitués d'une chaîne polypeptidique α et d'une ou plusieurs chaînes γ ou ζ (à l'exception des RFcγII qui ne possèdent qu'une chaîne α) permettant la transmission intracellulaire du signal par l'intermédiaire d'un motif ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) dans le cas des RFcγ activateurs et d'un motif ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) dans le cas des RFcγ inhibiteurs.

Les motifs ITAM, exprimés par les RFcγI, RFcγIIA, RFcγIIC, RFcγIIIB chez l'homme et RFcγI, RFcγIII et RFcγIV chez la souris permettent le recrutement des kinases de la famille Syk, qui stimulent les fonctions effectrices de la cellule (Amigorena et al., 1992a ; Fridman et al., 1992) (Figure 12). A l'inverse, les motifs ITIM recrutent des phosphatases qui s'opposent aux signaux des RFcγ activateurs ; (Amigorena et al., 1992b ; Daëron et al., 1995 ; Nimmerjahn et Ravetch, 2008 ; Kim et Ashkenazi, 2013). La complexité des RFcγ est reflétée par celle de la fixation des sous-classes d'IgG humaines (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) et murines (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) qui se fixent aux différents RFcγ avec de plus ou moins bonnes affinités, conduisant à différentes capacités effectrices. Les isotypes IgG2a et IgG2b, qui

fixent fortement le RFcγI et de façon « intermédiaire » le RFcγIV, ont une meilleure activité anti-tumorale *in vivo* que les IgG1 et IgG3 (Kipps et al., 1985 ; Nimmerjahn et Ravetch, 2006). Les cellules de l'immunité innée telles que les macrophages, les mastocytes, les monocytes, les DCs et les granulocytes expriment aussi bien les RFcγ activateurs qu'inhibiteurs (Kim et Ashkenazi, 2013). Chez la souris, les monocytes et les macrophages expriment tous les RFcγ activateurs et inhibiteurs, alors que les DCs expriment essentiellement les RFcγI, RFcγII et RFcγIII. En revanche, les cellules NK n'expriment que le RFcγIII, et les lymphocytes B n'expriment le RFcγII, ce qui constitue chez ces cellules un élément important de régulation du signal d'activation transmis par le BCR.

L'ADCC est un mécanisme permettant l'engagement des cellules de l'immunité innée après reconnaissance du complexe anticorps-cellule tumorale (Figure 11). Ce mécanisme est dépendant du RFcγIII et se fait préférentiellement par reconnaissance des anticorps d'isotype IgG1 chez l'Homme. L'importance de ce mécanisme dans la réponse thérapeutique anti-tumorale a été démontrée indirectement dans des modèles murins où l'expression des différents RFcγ activateurs a été invalidée, provoquant une inhibition de la capacité d'induire l'ADCC. L'invalidation du RFcγII inhibiteur, en revanche, conduit à une amélioration de la réponse immunitaire anti-tumorale en levant un des points d'inhibition de cette réponse.

Tous les AcM anti-CD20 ont été décrits comme étant capables d'ADCC. En revanche, si le rituximab et l'ofatumumab présentent des capacités similaires d'induction de mort cellulaire (Reff et al., 1994 ; Cheson, 2010), l'obinutuzumab a été optimisé pour induire une ADCC plus forte (Mössner et al., 2010 ; Golay et al., 2013), grâce à une modification de la glycosylation de sa région Fc (Jefferis, 2009) qui induit une plus forte affinité pour le RFcγIIIa humain ; l'impact clinique d'une meilleure affinité des IgG1 pour le RFcγIIIa a été démontré par l'étude de l'impact du polymorphisme du RFcγIIIa sur la réponse clinique au rituximab. Le remplacement d'une phénylalanine F par une valine V en position 158 confère une plus grande affinité du RFcγIIIa pour les IgG1 humaine. Une étude a ainsi démontré que les patients atteints de lymphomes et porteurs de l'allèle codant l'isoforme 158V répondaient mieux au traitement par rituximab (Cartron et al., 2002). En revanche, il a été avancé que les mécanismes de CDC et d'ADCC ne fonctionnent pas de manière synergique mais de manière compétitive : en 2009, une étude a utilisé un modèle murin de lymphome traité par un anti-CD20 pour démontrer que la déplétion du C3 avant le traitement par AcM améliorait la survie des animaux et l'activation des cellules NK (Wang et al., 2009). Par contre, une autre étude a

suggéré que les mécanismes de CDC et d'ADCC fonctionnent de façon complémentaire (Meerten et al., 2006) ; l'efficacité de la CDC serait directement proportionnelle au niveau d'expression du CD20 sur les cellules et l'expression de CD20 requise pour obtenir une CDC optimale serait beaucoup plus importante que celle requise pour l'ADCC.

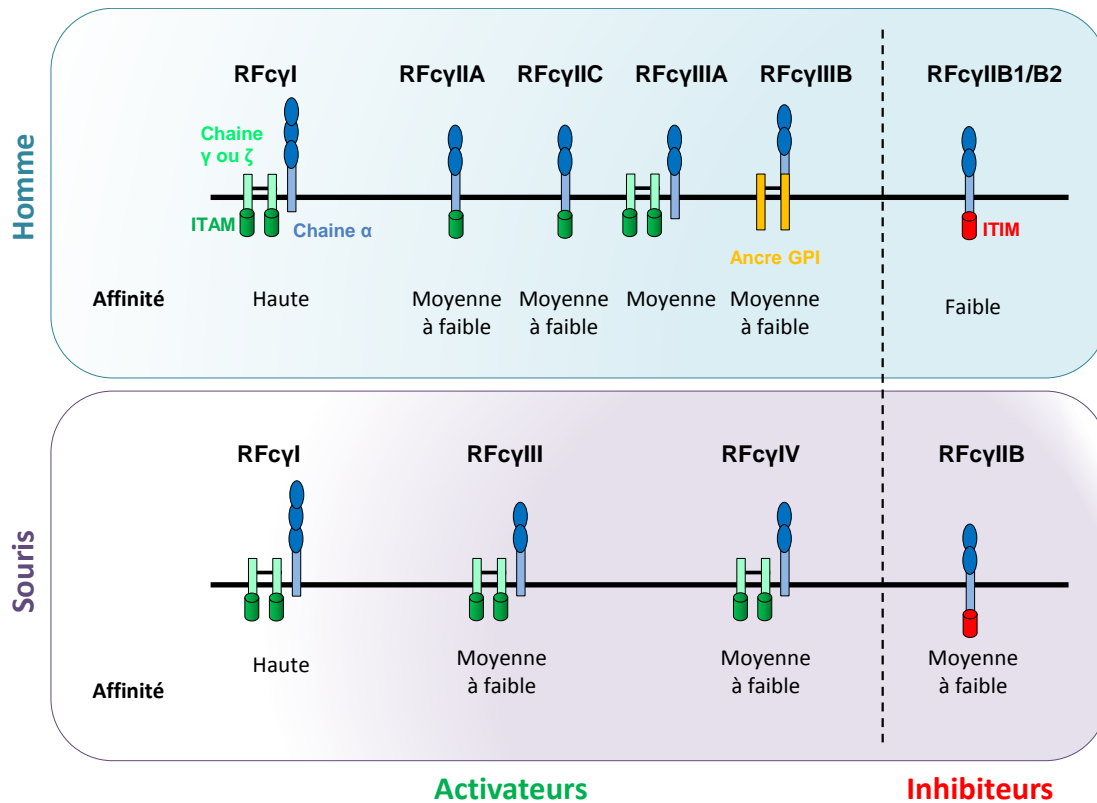


Figure 12. Les RFcγ activateurs et inhibiteurs humains et murins. Chez l'homme, il existe cinq RFcγ activateurs, contre trois chez la souris. Seul le RFcγI est de haute affinité, les autres ayant des affinités moyennes ou faibles. Chez les deux espèces, le RFcγIIB (appelé RFcγII chez la souris qui n'exprime pas de RFcγIIa) est un récepteur inhibiteur. Adapté de la thèse du Dr. Riad Abès.

3. La phagocytose par les DCs

Les DCs immatures sont capables d'internaliser des molécules par différents mécanismes tels que la phagocytose, l'endocytose, ou la macropinocytose. Les particules opsonisées par des IgG sont phagocytées grâce aux RFcγ des phagocytes (Underhill et Goodridge, 2012) (Figure 11). La phagocytose des cellules tumorales opsonisées se poursuit dans le cytoplasme des

DCs, avec la fusion entre phagosomes et lysosomes, pour aboutir à la dégradation des cellules phagocytées. Ce processus a pour conséquence la maturation des DCs et la présentation antigénique. Les peptides issus de la dégradation des cellules tumorales sont présentés sur les molécules du CMH de classe I, qui présentent les peptides endogènes aux lymphocytes T CD8⁺, et sur les molécules du CMH de classe II, qui présentent quant à eux les peptides issus de la phagocytose aux lymphocytes T CD4⁺. Il existe un mécanisme, la présentation croisée (cross-présentation), grâce auquel un peptide exogène peut être exprimé sur les molécules du CMH de classe I, et donc activer directement les lymphocytes T CD8⁺. Le processus de présentation croisée est spécifique à certaines sous-populations de DCs, comme les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) et les DCs CD8α⁺ chez la souris et CD141⁺ chez l'Homme. Il permet, dans le cadre des cancers, l'activation directe de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques. De façon générale, il a été démontré que la présence de complexes immuns favorise grandement les capacités de présentation croisée des DCs, par l'intermédiaire de la signalisation induite par les motifs ITAM des RFcγ activateurs (Regnault et al., 1999 ; Liu et al., 2006).

Bien que l'expression de RFcγ activateurs et inhibiteurs conduise à la phagocytose de la cellule opsonisée, le type de RFcγ engagé affecte directement la réponse immunitaire subséquente. L'internalisation intervenant via des RFcγ aux motifs ITAM favoriserait la présentation d'antigènes et donc l'activation des lymphocytes T. Les motifs ITIM, en revanche, conduiraient à une stimulation lymphocytaire moindre (Kalergis et Ravetch, 2002). Par ailleurs, une forte expression du RFcγIIb par les lymphomes non-Hodgkiniens a été associée à un mauvais pronostic (Camilleri-Broët et al., 2004). Plusieurs études ont montré que les antigènes liés à un anticorps permettent aux DCs d'activer plus efficacement des lymphocytes T spécifiques qu'un antigène non complexé (Heijnen et al., 1996 ; Regnault et al., 1999), ce qui implique que les RFcγ interviennent également dans les processus de présentation antigénique, et donc de mémoire immunitaire.

Enfin, certaines études suggèrent que la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en sous-type particulier (Th1, Th2, Th17) peut être liée au type de RFcγ exprimé par les DCs. La signalisation via les motifs ITAM induit l'expression des signaux de co-stimulation mais aussi la production d'IL-12, cytokine étroitement impliquée dans la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ vers les lymphocytes Th1. Par ailleurs, la down-régulation du RFcγIIb dans les DCs provoque une augmentation de la production d'IL-12 et une diminution du développement de Tregs, associé à des syndromes auto-immuns (Samsom et al., 2005 ; McGaha et al., 2008).

4. Effets directs

Différents travaux portant sur les mécanismes d'action des anticorps anti-CD20 ont montré que certains d'entre eux pouvaient induire directement une mort de la cellule cible, ce qui rendrait compte de leur efficacité au plan clinique (Figure 9). Cependant, les capacités du rituximab à induire une apoptose des cellules tumorales restent très controversées, notamment quand cet anticorps n'est pas lui-même agrégé. De plus, le type d'apoptose induite est lui-même sujet à discussion (activation de la voie des caspases et/ou indépendance de l'apoptose par rapport à cette voie). Différentes études ont montré que la fixation du rituximab à CD20 était associée à la formation de radeaux lipidiques, riches en cholestérol et sphingolipides, phénomène qui a été relié aux capacités d'apoptose de l'anticorps, du fait de ses capacités à induire une diminution de facteurs anti-apoptotiques après fixation à CD20 (Bcl2 et Bcl-xl). Une étude menée chez des patients atteints de LLC a rapporté une activation *in vivo* des caspase-3 et -9 immédiatement après infusion de rituximab, confirmant des études préliminaires (Byrd et al., 2002). Il existe cependant des contradictions entre les études *in vitro* et *in vivo* qui mettent à mal l'implication de la mort cellulaire programmée dans la déplétion des cellules exprimant CD20 *in vivo*. Alors que les cellules exprimant Bcl-2 sont plus résistantes aux stimuli apoptotiques *in vitro*, ce résultat n'est pas confirmé *in vivo*, ce qui rend compliqué l'interprétation de ces observations (Ofiazoglu et Audoly, 2010).

D'autres travaux ont cependant montré que le rituximab favorise l'enrichissement en céramides de ces radeaux lipidiques, associé à un accroissement de l'activité d'une sphingomyélinase acide, ce qui engendrerait une signalisation intracellulaire via une activation d'inhibiteurs de kinases ayant pour conséquence l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, mais sans se traduire par une apoptose (Bezombes et al., 2004). En particulier, le rituximab aurait pour effet d'inhiber l'activité de la *protein kinase C* ζ (PKC ζ), impliquée dans la voie de signalisation de mTOR et la dérégulation de la prolifération cellulaire classiquement associée aux cellules de LF (Leseux et al., 2008).

C. Effets vaccinaux des AcM en oncologie ?

a. Données obtenues chez les patients traités par AcM

Un certain nombre d'observations cliniques ont ouvert la voie à la possibilité que le traitement d'un cancer par un AcM puisse conduire au contrôle de la croissance tumorale grâce à une immunité adaptative efficace à long terme. Le traitement de patients atteints de lymphomes non-Hodgkiniens par l'AcM anti-CD20 rituximab a suggéré l'induction d'une réponse immunitaire à long terme, ayant éventuellement une influence sur la survie des patients. Une première étude menée par Cartron et al. en 2004 a permis de constater que le temps de progression chez des patients ayant répondu au rituximab et ayant par la suite rechuté était plus long lors d'une seconde thérapie avec le rituximab qu'après la première. Une seconde étude a démontré que le taux de réponses cliniques chez des patients répondeurs est plus important lorsque le rituximab est administré comme thérapie de maintenance (Figure 13).

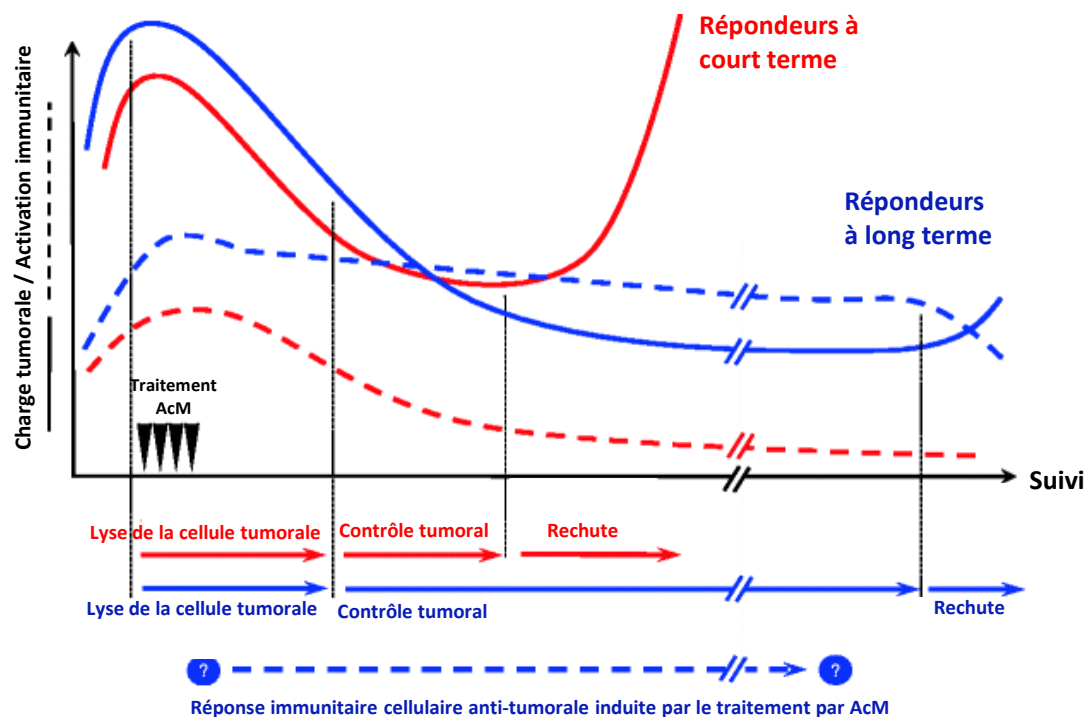


Figure 13. Contrôle de la charge tumorale et de la réponse clinique par les AcM anti-tumeur. D'après Abès et al., 2011.

Le ciblage des idiotopes a été l'une des stratégies la plus prometteuse pour l'obtention d'un effet vaccinal. Les idiotopes sont des déterminants antigéniques portés par les séquences VH et VL des anticorps ; les Ig de surface des lymphomes B offrent ainsi un marqueur spécifique de ces cellules pour un patient donné. En 2009, une équipe est parvenue à mettre en évidence une réponse immunitaire T dirigée spécifiquement contre les idiotypes des Ig exprimés à la surface des cellules tumorales de patients atteints de LF suite à un traitement par le rituximab (Hilchey et al., 2009). Ces résultats ont conduit à un essai clinique où des patients atteints de LF ont été traités par une immunothérapie combinée ou non avec une vaccination anti-idiotypique (Levy et al., 2014). Cet essai n'a cependant pas été concluant et aucune différence statistique de survie n'a été observée entre les deux groupes.

L'induction d'une immunité anti-tumorale adaptative a également été observée dans d'autres cancers, comme chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatique traitées par le trastuzumab. Le trastuzumab est un AcM reconnaissant HER2/Neu, une molécule surexprimée dans 20 à 30% des cancers du sein. Cet anticorps a obtenu une AMM en 1998 pour le traitement des cancers du sein métastatique HER2/Neu⁺. Il a été rapporté que les lymphocytes T CD4⁺ de certaines patientes traitées par le trastuzumab étaient stimulés en présence de peptides dérivés de HER2/Neu (Taylor et al., 2007). Par ailleurs, des réponses immunitaires T spécifiques de la molécule MUC1 ont été observées chez des patients cancéreux traités avec un AcM anti-MUC1 (de Bono et al., 2004).

Chez les patients atteints de lymphomes, d'autres signes plus indirects semblent signer une immuno-surveillance lymphocytaire T liée au traitement par le rituximab. En premier lieu, lors de la reconstitution du pool de lymphocytes B endogènes suite à l'arrêt du traitement par un anticorps anti-CD20, plusieurs anomalies ont été notées (Figure 14B) : chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, il a été remarqué que, plus de six ans après l'arrêt du traitement, les lymphocytes B mémoires CD27⁺ IgD⁺ n'ayant pas encore subi de commutation de classe présentaient d'importants délais dans l'acquisition d'hypermutations somatiques, suggérant que ces cellules, plus que les autres sous-populations de lymphocytes B, sont affectées à très long terme par le traitement par le rituximab (Muhammad et al., 2009). De même, la déplétion des lymphocytes B endogènes peut provoquer lors de la reconstitution une expansion des lymphocytes B régulateurs (Bregs) immunosuppresseurs et producteurs d'IL-10, normalement très minoritaires en conditions physiologiques (Horikawa et al., 2011 ; Bodogai et al., 2013).

Une étude parue cette année suggère enfin qu'il y aurait une immuno-surveillance T préexistante spécifiquement dirigée contre les lymphocytes B malins (Afshar-Sterle et al., 2014), capable de contrôler la croissance tumorale dès l'apparition de celle-ci. Une étude de 2004 avait déjà démontré l'existence de lymphocytes T CD8⁺ reconnaissant certains peptides des molécules CD19 et CD20 chez des individus sains, suggérant là aussi la présence d'une immuno-surveillance T (Grube et al., 2004) (Figure 14A). Une telle immuno-surveillance, si elle est prouvée, permet donc d'entrevoir la possibilité de manipuler cette réponse chez les patients, par exemple avec le rituximab. Chez des patients atteints de LF, un nombre accru de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ du sang périphérique et intra-tumoraux a été associé à une meilleure réponse au traitement par le rituximab et à la survie des patients (Wahlin et al., 2011). Enfin, plusieurs études ont mis en évidence la récurrence de lymphomes CD20⁻ lors d'une rechute après le traitement par le rituximab (Miyoshi et al., 2012, Maeshima et al., 2013) (Figure 14D). Ces cellules tumorales expriment alors faiblement ou pas du tout la molécule CD20, suggérant que la ré-expansion des cellules CD20⁺ est contrôlée par une immunité adaptative anti-CD20 agissant à très long terme et à laquelle les cellules tumorales échappent en diminuant ou perdant l'expression de CD20.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'administration d'AcM chez des patients atteints de cancer peut conduire à l'apparition d'une immunité anti-tumorale spécifique de l'antigène reconnu par l'anticorps, une véritable vaccination anti-tumorale.

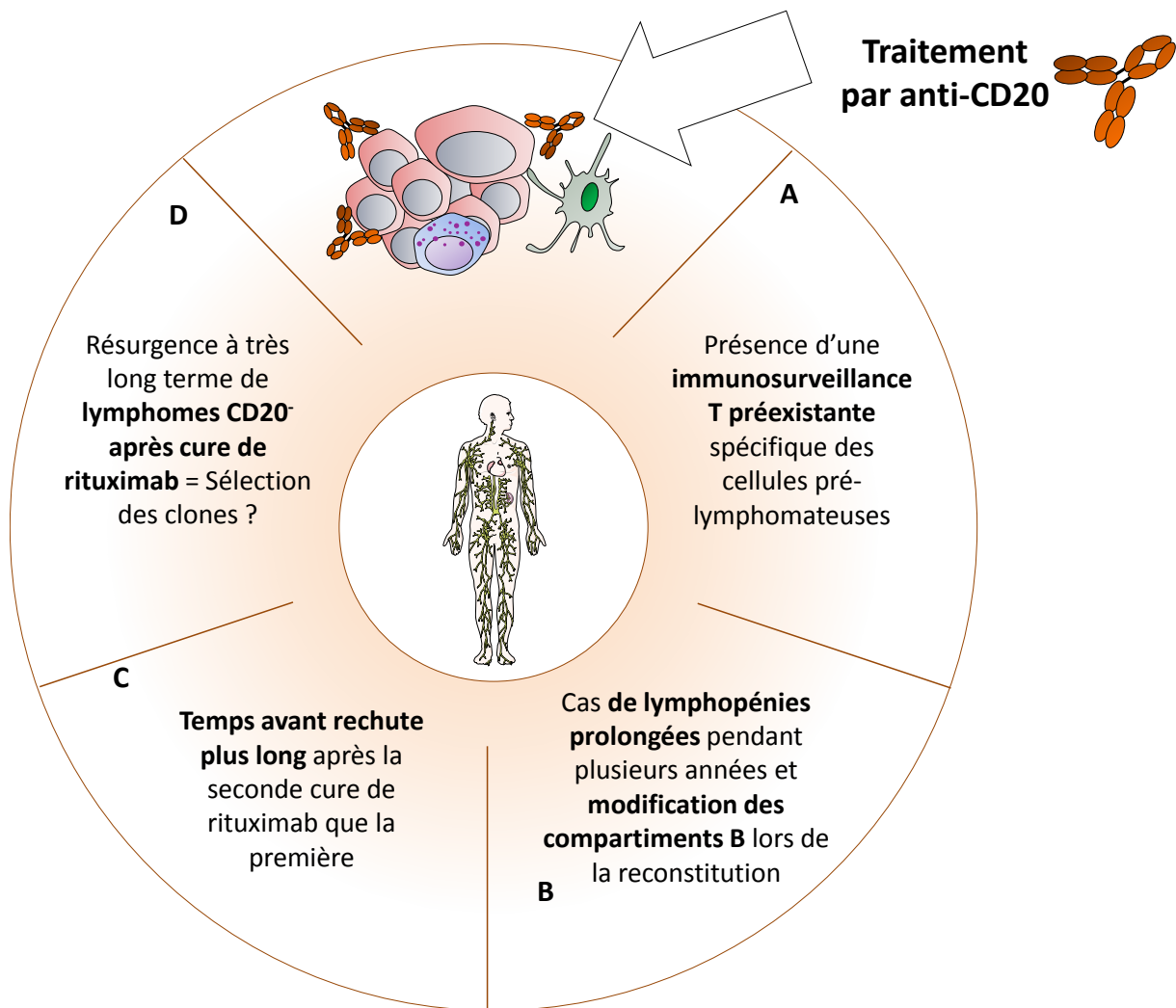


Figure 14. Signes cliniques de l'induction d'un effet vaccinal chez les patients traités avec le rituximab. Le traitement avec le rituximab conduit chez certains patients à l'apparition de signes cliniques faisant penser à l'apparition d'une immunité anti-tumorale adaptative. A : plusieurs études ont mis en évidence la présence de lymphocytes T spécifiques des lymphocytes B pré-tumoraux chez des individus sains. B : certains patients souffrent d'une lymphopénie prolongée après un traitement par le rituximab, et un biais de répartition des sous-populations lymphocytaires B a été observé. C : des patients atteints de LF et traités par le rituximab présentent une rémission plus longue après une deuxième cure d'AcM qu'après la première. D : chez des patients atteints de LF et traités par le rituximab, une récurrence du lymphome est observée ; il a été montré que les cellules lymphomateuses de certains de ces patients ont alors perdu l'expression de la molécule CD20.

b. Descriptions pré-cliniques d'effets vaccinaux des AcM

i. L'implication des lymphocytes T CD8⁺

L'hypothèse selon laquelle un traitement par AcM peut induire une réponse à long terme vis-à-vis de la tumeur et plus particulièrement l'induction de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ a donc été intensivement étudiée dans des modèles pré-cliniques (Tableau 3).

Dans un modèle murin de tumeur mammaire traitée avec un AcM anti-HER2/Neu, une équipe de chercheurs a démontré que la réponse immunitaire mise en place dans des souris sauvages *wt* était abrogée chez des souris Rag-1^{-/-} n'ayant ni lymphocyte B ni lymphocyte T. La déplétion des lymphocytes T CD8⁺ chez les animaux *wt* conduit de plus à une perte de contrôle de la croissance tumorale, démontrant la nécessité de la présence de ces cellules dans l'élaboration d'une réponse immunitaire anti-tumorale protectrice dans ce modèle. Ces cellules sont capables de produire de l'IFN- γ et de protéger les animaux de ré-injections tumorales ultérieures, suggérant l'existence d'une mémoire immunitaire vaccinale (Park et al., 2010). En 2012, la même équipe a utilisé un modèle expérimental de tumeur traitée avec un AcM anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), le cétuximab, largement utilisé en clinique pour le traitement de tumeurs solides, pour démontrer que la réponse anti-tumorale est là-aussi dépendante des lymphocytes T CD8⁺ (Yang et al., 2013). Chez l'Homme, une étude semble confirmer ces observations : des patients atteints de cancer de la tête et du cou ont été traités par le cétuximab, conduisant directement à une augmentation du pool de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'EGFR, cette réponse adaptative étant initialement dépendante des cellules NK et de l'expression du RFc γ IIIa (Srivastava et al., 2013).

Par ailleurs, un modèle de souris infectées par le rétrovirus FrCas(E) a montré qu'une réponse immunitaire adaptative anti-virale était mise en place après traitement des animaux avec un AcM neutralisant dirigé contre une protéine de l'enveloppe virale. Ce traitement par anticorps était par ailleurs capable d'inhiber une expansion des Tregs immunosuppresseurs associés aux infections virales chroniques (Nasser et al., 2013).

ii. L'implication des lymphocytes T CD4⁺

Historiquement, la première démonstration du rôle des lymphocytes T CD4⁺ dans une réponse immunitaire anti-tumorale consécutive à un traitement par AcM a été faite en utilisant un anticorps reconnaissant l'enveloppe du virus de la leucémie de Friend, gp70, présent à la surface des cellules leucémiques. Il a alors été montré que l'effet protecteur de l'AcM était perdu après déplétion des lymphocytes CD4⁺ (Sala et al., 1992). Beaucoup plus récemment, des chercheurs ont utilisé un modèle de tumeur mammaire traitée avec un anticorps anti-neu pour démontrer que la déplétion des lymphocytes CD4⁺ abrogeait l'effet anti-tumoral du traitement. L'IFN- γ produit par ces cellules, en plus de son action anti-tumorale, était capable d'induire l'expression des molécules du CMH II à la surface des cellules tumorales, permettant ainsi une reconnaissance directe de ces cellules par les lymphocytes T CD4⁺ et ainsi l'induction d'une réponse spécifique de HER2/Neu. Par ailleurs, dans cette étude, l'expression de la molécule CD40 par les cellules du microenvironnement tumoral s'est avérée indispensable à la mise en place d'une réponse effectrice à long terme. La liaison de CD40 avec son ligand, CD40L, permet la sensibilisation (le « priming ») des lymphocytes T CD8⁺ par les lymphocytes T CD4⁺ (Mortenson et al., 2013).

En 2010, notre équipe a utilisé un modèle de souris C57Bl/6 injectées par voie intraveineuse avec des cellules tumorales CD20⁺ et traitées de façon itérative avec un anticorps anti-CD20 pour étudier l'implication des lymphocytes dans le contrôle à court et à long terme de la croissance tumorale (Abès et al., 2010). Le traitement des animaux porteurs de tumeurs avec l'AcM anti-CD20 conduit à 70% de survie en moyenne. L'utilisation de souris n'exprimant pas CD8 (« CD8-KO ») a démontré que ces cellules n'étaient pas nécessaires au contrôle de la tumeur. En revanche, la déplétion des cellules CD4⁺ a conduit à une diminution drastique du taux de survie des animaux, démontrant que ces cellules sont essentielles à la réponse immunitaire anti-tumorale liée à l'anticorps. Lorsque les animaux traités avec l'AcM anti-CD20, survivants, ont été réinjectés avec les mêmes cellules tumorales deux mois après la première injection, la présence des cellules CD4⁺ et des cellules CD8⁺ se sont avérées être nécessaires à la protection anti-tumorale. Le transfert adoptif de splénocytes isolés à partir de souris porteuses de tumeur et traitées avec l'anticorps anti-CD20 à des animaux naïfs permet le contrôle de la tumeur sans aucun traitement.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ peuvent jouer un rôle critique dans la réponse immunitaire anti-tumorale mise en place en réponse à un traitement par un anticorps thérapeutique. Ces cellules sont capables d'exercer une action directe et spécifique vis-à-vis des cellules tumorales, mais aussi d'induire une mémoire immunitaire contre la tumeur, protectrice contre d'autres réinjections tumorales. Ces résultats conduisent également à l'idée que cet effet vaccinal des AcM en oncologie peut être optimisé grâce à des traitements combinant des thérapies de nature différentes.

Tableau 3. Etudes démontrant l'implication du système immunitaire adaptatif dans la réponse anti-tumorale faisant suite à un traitement par AcM.

Anticorps	Tumeur ciblée	Stade d'évaluation	Cellules impliquées dans la réponse immunitaire	Références
Anti-MUC1	Tumeur solide MUC1 ⁺	Clinique	Lymphocytes T et B (production d'Ac)	(de Bono et al., 2004)
Anti-HER2/Neu (ErbB-2) (trastuzumab)	Tumeur solide HER2/Neu+	Clinique	Lymphocytes B (production d'Ac) et lymphocytes T CD4 ⁺	(Taylor et al., 2007)
Anti-HER2/Neu (ErbB-2) (7.16.4)	Cancer du sein	Préclinique (souris), s.c. ^a	Lymphocytes T CD8 ⁺	(Park et al., 2010)
Anti-HER2/Neu (ErbB-2) (7.16.4)	Cancer du sein	Préclinique (souris), s.c. ^a	Lymphocytes T CD8 ⁺	(Stagg et al., 2011)
Anti-CD20 (rituximab)	Lymphome folliculaire	Clinique	Lymphocytes T	(Hilchey et al., 2009)
Anti-CD20 (CAT-13)	Lymphome	Préclinique (souris), i.v. ^a	Lymphocytes T CD4 ⁺	(Abès et al., 2010)
Anti-HER2/Neu (ErbB-2) (7.16.4)	Cancer du sein	Préclinique (souris), s.c. ^a	Lymphocytes T CD4 ⁺ et CD8 ⁺	(Mortenson et al., 2013)
Anti-GP70 Env (Friend Leukemia virus) (A9D41)		Préclinique (souris), s.c. and i.v. ^a	Lymphocytes B (production d'Ac) et lymphocytes T CD4 ⁺	(Sala et al., 1992)
Anti-FrCas ^E Env glycoprotein (667)	Leucémie (induite par infection par FrCas ^E (i.p. ^b))	Préclinique (souris), s.c. ^a	Lymphocytes B (production d'Ac), Lymphocytes T CD8 ⁺ cytotoxiques, Tregs	(Nasser et al., 2013)

^a Voie d'injection des cellules tumorales : s.c., sous-cutanée ; i.v., intraveineuse

^b i.p., injection intra-péritonéale du rétrovirus FrCas^E

c. Implications cliniques

i. Co-traitements : immunogénicité de la radiothérapie et de la chimiothérapie

Cette vision nouvelle des AcM en oncologie comme étant des outils thérapeutiques capables d'induire des effets vaccinaux peut avoir un impact important sur les combinaisons thérapeutiques proposées aux patients mais aussi sur leur articulation temporelle, en particulier les protocoles de chimiothérapie et de radiothérapie, qui sont aujourd'hui massivement utilisés pour traiter la plupart des cancers. Environ 50% des patients tous cancers confondus reçoivent un traitement de radiothérapie à un moment donné ou l'autre de l'évolution de leur maladie, seule ou en combinaison avec d'autres traitements. Récemment, il a été montré que l'irradiation de cellules de lymphome provoquait l'augmentation de l'expression membranaire de CD20 et améliorait la qualité d'un traitement avec un AcM anti-CD20 à la condition que celui-ci intervienne après la radiothérapie (Singh et al., 2014). Des travaux récents démontrent que des cellules tumorales ayant reçu un traitement de chimiothérapie ou de radiothérapie peuvent présenter des caractéristiques de mort immunogénique (Figure 15). L'analyse protéique des cellules subissant une mort cellulaire immunogénique (MCI) a révélé l'exposition membranaire de la calréticuline (CRT), une protéine chaperonne dont l'expression est normalement restreinte au réticulum endoplasmique (Obeid et al., 2007). La MCI s'accompagne également de la libération de HMGB1 (pour « High-Mobility Group Box 1 »), une molécule de stress dont le relargage extracellulaire est couramment associé à un statut pro-inflammatoire. HMGB1 a été détectée dans le microenvironnement de cellules tumorales subissant une MCI. En particulier, HMGB1 est l'un des ligands endogènes de TLR4 (Toll-Like Receptor 4), un récepteur de pathogènes bactériens et de signaux de dangers exprimé entre autre par les DCs (Apetoh et al., 2007). Ce phénomène joue donc un rôle direct sur l'activation de l'inflammasome, responsable en premier lieu de la sécrétion d'IL-1 β . Associé à la libération extracellulaire d'ATP, l'ensemble de ces mécanismes constitue des signaux suffisants pour permettre la maturation des DCs et l'activation des lymphocytes T CD8⁺, capables d'exercer une cytotoxicité anti-tumorale et de produire de l'IFN- γ .

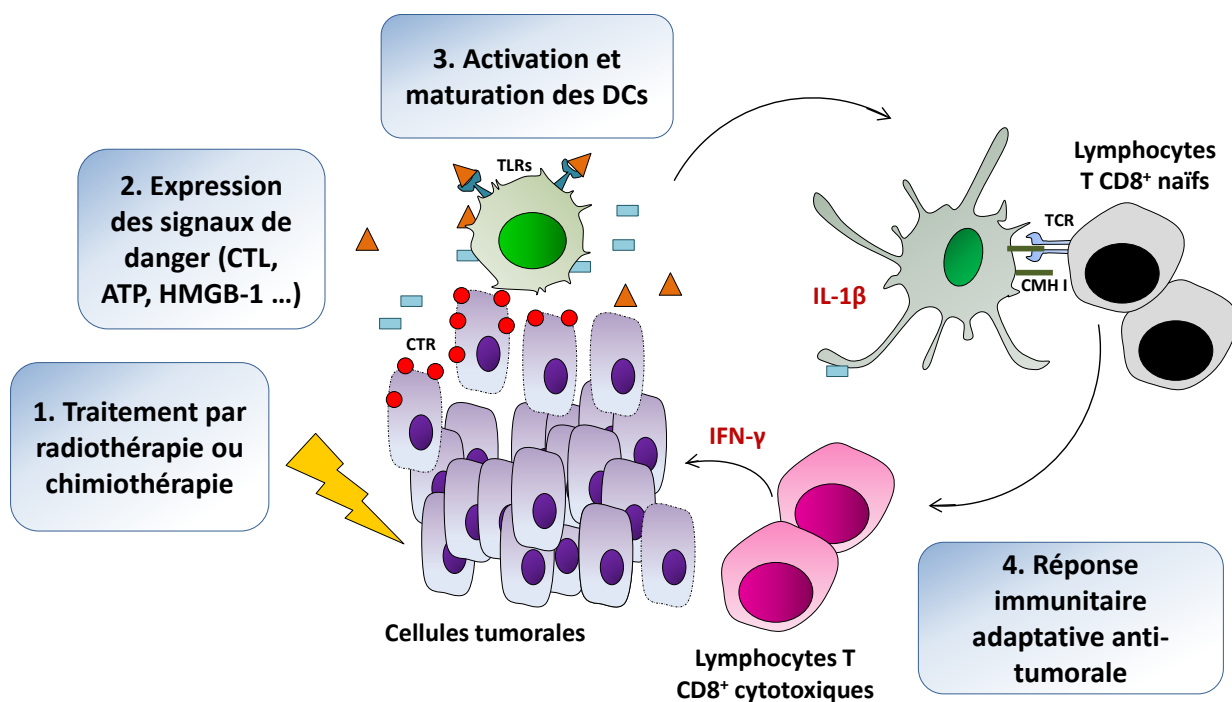


Figure 15. Induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale adaptative par traitement par radiothérapie ou par chimiothérapie. L'irradiation ou le traitement des cellules tumorales provoque leur mort cellulaire immunogénique. L'expression membranaire de la CRT permet la phagocytose des cellules et la libération d'ATP et HMGB1 la maturation des DCs. Les DCs activées migrent vers les ganglions lymphatiques et activent les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques. Ceux-ci pourront revenir sur le site tumoral pour exercer une action cytotoxique.

Ces mécanismes peuvent-ils venir compléter l'action vaccinale des anticorps à usage thérapeutique ? Dans leur étude préclinique menée chez des souris immunocompétentes porteuses d'une tumeur sous-cutanée HER2/Neu⁺ et un traitement par AcM anti-neu, Park *et coll.* ont observé que la réponse immunitaire adaptative anti-tumorale induite par le traitement des souris avec l'anticorps anti-neu était abrogée chez des souris MyD88^{-/-} ou lorsque HMGB1 était neutralisé (Park et al., 2010). La dépendance de ce mécanisme aux signaux de danger émis en cas de MCI a poussé ces auteurs à étudier l'effet de la chimiothérapie en combinaison avec le traitement par l'anticorps anti-neu. Dans ce modèle, la doxorubicine (DOX), le paclitaxel (PTX) et le cyclophosphamide (CPX) injectés 3 à 5 jours après l'anticorps, conduisent tous à une accélération de la régression tumorale par rapport au traitement avec l'AcM anti-neu seul. Ces drogues de chimiothérapie, utilisées seules, ont un impact beaucoup moins important que l'anticorps seul sur la croissance tumorale. Les auteurs

ont alors utilisé plusieurs doses de PTX (40 et 60 mg/Kg) et démontré que si la dose utilisée n'a pas d'importance à l'initiation du traitement, elle a un impact majeur sur la mémoire immunitaire mise en place. En effet, les animaux traités avec des doses plus élevées de PTX résistent plus difficilement à la réinjection tumorale, plusieurs mois après le traitement initial. Cet effet négatif est abrogé lorsque les souris reçoivent une dose de PTX avant l'injection de l'anticorps anti-neu.

Ces résultats suggèrent d'une part que le traitement de patients cancéreux combinant un AcM et une radiothérapie ou une chimiothérapie peut être envisagé afin d'améliorer la qualité de la réponse immunitaire mise en place contre la tumeur, et, d'autre part, qu'il existe une séquence temporelle optimale d'utilisation de ces drogues afin de potentialiser cette réponse et non pas l'affecter négativement.

ii. Traitements combinatoires : les thérapies de demain

Un autre moyen pour améliorer l'effet vaccinal des mAb anti-CD20 consiste à utiliser une combinaison d'immunothérapies alliant un anticorps-CD20 avec un anticorps visant à activer les cellules du système immunitaire adaptatif. Plusieurs approches sont actuellement abordées en ce sens.

Deux études précliniques utilisant des modèles de lymphome traités avec un anticorps anti-CD20 ont eu pour but d'améliorer l'efficacité de cet AcM. L'équipe du Prof. Ronald Levy a dans un premier temps démontré que le traitement de souris porteuses de lymphome avec un anticorps anti-CD20 conduisait à la mort des cellules tumorales par une ADCC due aux cellules NK, et que ces cellules, une fois activées, présentaient une expression de surface de la molécule co-stimulatrice CD137 (Kohrt et al., 2011). Dans un second temps, la même équipe a alors montré que le traitement successif des souris avec l'AcM anti-CD20 puis un anticorps agoniste de CD137 permettait d'améliorer leur survie par rapport aux monothérapies. De plus, cette réponse anti-tumorale est apparue être dépendante du système immunitaire adaptatif et des lymphocytes T CD8⁺ en particulier, suggérant que l'activation des cellules NK permet directement un recrutement de lymphocytes T spécifiques. Cette étude est à l'origine d'un essai clinique de phase I, en cours, où des patients reçoivent une thérapie combinatoire faite d'un anticorps anti-CD137 et d'un anticorps anti-CD20, le rituximab (Kohrt et al., 2014a).

La même équipe a proposé un système similaire mais utilisant un anticorps antagoniste anti-KIR visant à augmenter l'activité cytotoxique des cellules NK en inhibant la signalisation des KIR (Kohrt et al., 2014a). En combinaison avec un anti-CD20, cet anticorps a permis une amélioration de la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis des cellules tumorales. L'équivalent humain de cet anti-KIR, le lirilumab, devrait être testé en clinique.

Chez l'Homme, un essai clinique de Phase II a récemment mis en lumière l'effet de la combinaison du rituximab avec un anticorps anti-PD-1, le pidilizumab (Westin et al., 2014). Des patients atteints de LF ont reçu des infusions de pidilizumab puis de rituximab. Ce traitement a montré des réponses cliniques meilleures que celles obtenues avec le rituximab utilisé en monothérapie ; ces résultats encourageants devraient se poursuivre avec des cohortes plus importantes. Ce traitement par le pidilizumab a de plus conduit à une expression des gènes d'activation des lymphocytes T et des cellules NK dans le microenvironnement tumoral, ainsi qu'à une augmentation du nombre absolu de lymphocytes T CD4⁺ mémoires circulants. Ces résultats suggèrent qu'un tel traitement influence directement la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative vaccinale.

Enfin, une étude de Phase 1b a évalué en 2014 la toxicité d'un traitement combinant R-CHOP et ibrutinib, un inhibiteur de BTK, chez des patients atteints de Lymphomes non-Hodgkiniens (Younes et al., 2014). Le succès de cette étude a conduit au développement d'une étude actuellement en cours visant à évaluer le bénéfice clinique apporté par une telle combinaison. Il est cependant important de noter qu'une étude également parue en 2014 démontre que l'ibrutinib inhibe directement l'activité ADCC des cellules NK liée au traitement par anticorps anti-CD20 (Kohrt et al., 2014b).

La multiplication des essais de traitements combinatoires associant un anticorps anti-CD20 et un anticorps modulant l'activité des « checkpoints » immunitaires devrait conduire à la mise en place d'une immunité anti-tumorale protectrice à long terme chez les patients atteints de lymphome, ainsi qu'à l'amélioration de la survie. La compréhension des mécanismes pouvant conduire à une telle immunité reste cependant à être décryptée.

d. Optimisation de l'effet vaccinal des Ac

i. Les AcM bispécifiques

L'amélioration de l'ingénierie des anticorps des dernières années ouvre la porte à l'optimisation de l'effet vaccinal des AcM à usage thérapeutique, notamment l'élaboration d'anticorps bispécifique (BsAb) comme l'avait suggéré le Prof. David Segal et son équipe en 1990 (Snider et al., 1990). Tout au long des trente dernières années, depuis le travail pionnier de David Segal et de Michael Fanger (Karpovsky et al., 1984 ; Shen et al., 1986), des anticorps bi-spécifiques dirigés d'une part contre des antigènes associés aux tumeurs [HER2/Neu pour les cancers du sein, c-erbB-2 pour les cancers de l'ovaire, CD19 pour les lymphomes B, disialoganglioside (GD₂) pour les tumeurs de neuroblastome, ACE pour les cancers colorectaux...] et, d'autre part, contre des molécules activant soit des cellules de l'immunité innée (le RFcγI ou le RFcγIIIa) soit des cellules de l'immunité adaptative (CD3) ont été construits (Holliger et al., 1993 ; Weiner et al., 1993; Michon et al., 1995).

La possibilité de générer des anticorps bispécifiques (AcBs) de façon industrielle a ouvert désormais un champ très large en ce qui concerne les applications de ces AcBs. Différents formats d'AcBs existent actuellement allant d'AcBs comme l'AcBs issu de la technologie BiTE (« Bi-specific T-cell engagers ») (Bargou et al., 2008) ou des AcBs de domaines VHH de camélidés (Rozan et al., 2013) jusqu'à des formats d'IgG bispécifique incluant une région Fc, rendant ces derniers tri-fonctionnels (Milstein and Cuello, 1984 ; Ridgway et al., 1996 ; van der Neut Kolfshoten et al., 2007 ; Chelius et al., 2010) .

Plusieurs de ces anticorps tri-fonctionnels sont actuellement développés, notamment par la firme TRION Pharma en Allemagne (anti-EpCAM x anti-CD3, anti-HER2/Neu x anti-CD3, anti-CD20 x anti-CD3) (Chelius et al., 2010). L'AcBs anti-CD20 x anti-CD3, enregistré sous le nom FBTA05, a montré une importante activité cytotoxique *in vitro* vis-à-vis de cellules de lymphomes B CD20⁺ (Lameris et al., 2014). Cet anticorps fait actuellement l'objet d'une étude clinique de phase I/II où des patients atteints de lymphomes B résistants au rituximab ou à l'alemtuzumab (anti-CD52) sont traités avec cet AcM bispécifique (Buhmann et al., 2013). Une autre stratégie actuellement explorée consiste à cibler les DCs : un AcBs anti-CD20 x anti-Flt3 ligand, un facteur de croissance hématopoïétique impliqué dans le développement des DCs, est actuellement développé (Zhao et al., 2013). Le traitement de lymphomes murins avec cet AcBs a permis d'améliorer le contrôle de la croissance tumorale

à très long terme, protégeant les animaux contre des réinjections tumorales ultérieures. Cette protection est associée avec un nombre accru des DCs et de lymphocytes T CD8⁺ intra-tumoraux, suggérant en effet vaccinal grâce à la mise en place d'une immunité T spécifique de la tumeur suite au traitement par l'AcBs.

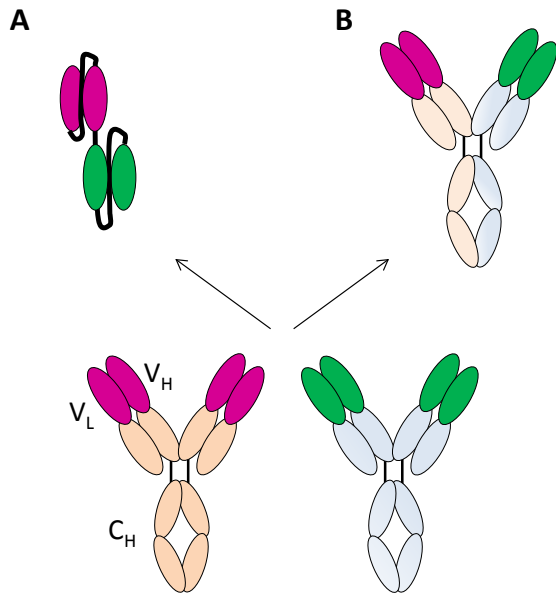


Figure 16. Exemple d'AcM bispécifiques générés pour le traitement des lymphomes. A : les domaines VH et VL de deux anticorps de spécificité différentes sont clonés sous forme d'anticorps simple chaîne (« single chain Fv, scFv »), liés entre eux par un espaceur flexible et hydrophile, non immunogénique (ex. : blinatumomab, anti-CD19 x anti-CD3). B : les chaînes H et L de deux anticorps de spécificités différentes sont associées pour donner un nouvel anticorps complet mais chimérique (ex. : FBTA05, anti-CD20 x anti-CD3)

Le blinatumomab est le plus avancé des anticorps bispécifiques. Cette molécule est constituée de fragments simple chaîne (« single chain Fv, scFv ») anti-CD3 et anti-CD19, liés par une région espaceur flexible et hydrophile (Figure 16A). Mis au point pour cibler les cellules de lymphomes B, très majoritairement CD19⁺, cet anticorps a déjà fait et fait l'objet d'essais cliniques de phases I et II chez des patients atteints de différents lymphomes (DLBCL, LLC-B, lymphomes du manteau) (Nagorsen et al., 2012) et de leucémie aiguë lymphoblastique (Topp et al., 2014). Les résultats préliminaires de l'étude menée chez les patients présentant un lymphome montrent que des infusions intraveineuses continues conduisent à des réponses complètes ou partielles (chez 16 des 20 patients évalués), assorties d'une survie à long-terme sans rechute chez 12 de ces 20 patients. Tous les patients présentaient un important pic d'activation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ après l'administration de l'AcBs (Nagorsen et

al., 2012). La petite taille de cette molécule provoque une diminution de sa demi-vie sérique mais elle atteint le site tumoral plus facilement.

L'apparition de ces nouvelles molécules dans le panel thérapeutique des AcM en oncologie permet de reconsidérer le traitement des patients. Ces anticorps bispécifiques, qui impactent le compartiment lymphocytaire T, devraient permettre d'améliorer la mise en place ou la stimulation d'une immunité anti-tumorale efficace chez les patients cancéreux et viennent renforcer le concept de vaccination anti-tumorale à l'aide d'anticorps à usage thérapeutique.

ii. Couplage à des cytokines

Afin de pallier aux effets secondaires importants des chimiothérapies et d'améliorer l'effet thérapeutique du rituximab en monothérapie, de nombreuses études cliniques ont, au cours de ces 15 dernières années, proposé des combinaisons d'anticorps anti-CD20 avec différentes cytokines inflammatoires dans l'espoir d'activer le système immunitaire de manière ciblée.

Au cours de la dernière décennie, différentes études ont comparé le bénéfice clinique apporté par une cure de R-CHOP seule par rapport à celui obtenu lorsque le rituximab a été combiné avec une infusion de cytokine. L'une des cytokines semblant constituer l'un des candidats les plus indiqués a été l'IL-12, une cytokine qui induit l'activation des lymphocytes T et des cellules NK (Trinchieri, 2003).

Un essai clinique de phase I a montré que l'IL-12 administrée à des patients atteints de lymphomes non-Hodgkiniens permettait une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ (Ansell et al., 2002), bien qu'aucun changement phénotypique dans les compartiments T et NK n'ait pu être démontré. L'essai clinique de phase II qui a suivi n'a cependant pu montrer un quelconque effet de l'IL-12 sur la progression du lymphome chez ces patients (Ansell et al., 2006). Parmi les explications proposées pour expliquer cet échec, il a été suggéré par l'équipe à l'origine des essais cliniques que l'IL-12 pouvait provoquer un épuisement des lymphocytes T infiltrant la tumeur, comme l'a suggéré alors l'expression de marqueurs d'épuisement cellulaire tels que TIM-3 (Yang et al., 2012).

Plusieurs études cliniques ont lancé des études similaires avec le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor). L'idée d'utiliser le GM-CSF en combinaison avec

le rituximab vient de la capacité de cette cytokine d'activer les cellules myéloïdes exprimant les RFc γ (macrophages, monocytes, DCs), ce facteur de croissance était par ailleurs connu pour améliorer les capacités d'ADCC de ces cellules et stimuler leur différenciation en CPA. Des essais cliniques de phase I et II ont été menés chez des patients atteints de lymphomes non-Hodgkiniens avec rituximab et GM-CSF et ont montré une amélioration de la réponse clinique des patients traités, en comparaison avec des patients traités seulement le rituximab. Ce bénéfice clinique s'est accompagné d'une prolifération des cellules myéloïdes périphériques ainsi que des lymphocytes T (Niitsu et al., 2004 ; Cartron et al., 2008). Cette immunothérapie combinatoire prometteuse se poursuit avec un essai de phase III chez des patients atteints de lymphomes non-Hodgkiniens et de LLC (Strati et al., 2014).

Dès l'obtention de l'AMM du rituximab pour le traitement des lymphomes, des études cliniques ont cherché à améliorer son effet en le combinant avec de l'IL-2. Les capacités de cette cytokine à stimuler l'activation et la différenciation des lymphocytes et des cellules NK en ont fait un candidat tout indiqué pour un traitement combinatoire. Les essais d'utilisation de l'IL-2 se sont pourtant arrêtés en Phase II (Friedberg et al., 2002 ; Gluck et al., 2004 ; Khan et al., 2006). Outre l'importante toxicité causée par cette molécule, aucun bénéfice clinique supplémentaire n'a été obtenu. Pour expliquer cet échec, les auteurs de ces études ont évoqué notamment la possibilité d'une stimulation de l'expansion de Tregs par cette cytokine, ces cellules immunosuppressives exprimant fortement CD25, la chaîne α du récepteur de haute affinité de l'IL-2. Plusieurs laboratoires cherchent actuellement à développer une IL-2 modifiée, capable de stimuler uniquement le récepteur d'affinité intermédiaire de l'IL-2 (sous-unité $\beta\gamma$) exprimé essentiellement par les lymphocytes T activés et les cellules NK et non celui de haute affinité exprimé par les Tregs (Gluck et al., 2004 ; Carmenate et al., 2013).

Enfin, plusieurs études ont utilisé l'IFN α en combinaison avec le rituximab (Davis et al., 2000 ; Sacchi et al., 2001), à l'origine de résultats mitigés. En 2008, le Groupe d'Etude de Lymphomes de l'Adulte, le GELA, a publié une étude où des patients atteints de LF (n =358) étaient traités avec le rituximab et une chimiothérapie, ou avec le rituximab, une chimiothérapie et l'IFN α 2a. Une meilleure survie chez les patients ayant reçu le rituximab et l'IFN α 2a a été montrée mais le risque de rechute des patients de mauvais pronostic ne change pas (Salles et al., 2008). Plusieurs groupes ont aussi développé des AcM anti-CD20 fusionnés à l'IFN α . Des tests effectués chez la souris ont démontré que ces anticorps modifiés étaient capables d'induire des réponses immunitaires plus importantes et une régression plus rapide que l'anticorps anti-CD20 seul ou utilisé en combinaison avec de l'IFN α libre,

suggérant que l'action anti-tumorale observée était bien spécifique d'une action locale combinée et non d'un effet systémique (Rossi et al., 2009 ; Xuan et al., 2010). Ces traitements de nouvelle génération semblent plus prometteurs que les combinaisons classiques de cytokines et d'AcM, administrés de façon dissociée, et vont continuer à être testés dans les années à venir.

Objectifs des travaux de thèse

L'utilisation des AcM en oncologie a longtemps été considérée comme une simple sérothérapie passive, n'ayant peu ou pas d'effet sur le système immunitaire du patient. Depuis quelques années, cette vision est en train de changer. Que ce soit avec les anticorps anti-HER2/Neu, anti-MUC1 ou anti-CD20, ce concept est en train d'être réexaminé. Des observations cliniques, associées à des études précliniques, montrent que ce type de traitement peut induire des réponses immunitaires adaptatives anti-tumorales endogènes efficaces. En particulier, mon laboratoire d'accueil a démontré pour la première fois que le traitement de souris immunocompétentes porteuses de tumeurs CD20⁺ par un AcM anti-CD20 pouvait conduire à une réponse immunitaire « vaccinale », les animaux étant protégés à long terme contre une réinjection ultérieure des cellules tumorales CD20⁺ (EL4-huCD20) (Figure 13) (Abès et al., 2010). En revanche, ces animaux survivants réinjectés avec des cellules EL4-*wt* ne sont pas capables de contrôler la croissance tumorale, suggérant une spécificité vis-à-vis du CD20 de cette réponse protectrice.

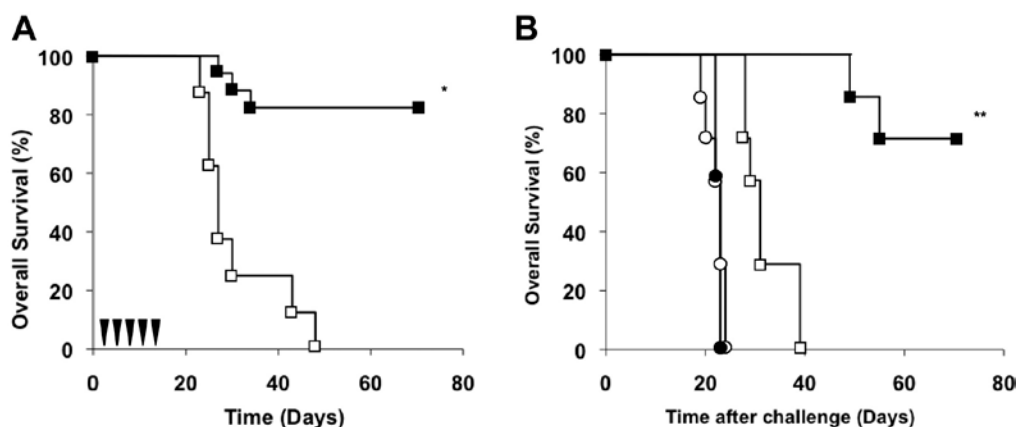


Figure 13. Le traitement par un anticorps anti-huCD20 conduit à une survie à long terme après réinjection tumorale *in vivo*. (A) Les souris ont été injectées avec 5×10^5 EL4-huCD20 (n=25) et divisées en 2 groupes. Les animaux du premier groupe (\square , n = 8) n'ont pas été traités. Les animaux du second groupe (\blacksquare , n=17) ont reçu un traitement par l'AcM anti-huCD20 CAT-13 ($5 \times 200 \mu\text{g}$ aux jours 1, 4, 7, 10, et 13). Les flèches noires désignent les injections de CAT-13. (B) Les souris survivantes au traitement ont été réinjectées avec soit 5×10^5 EL4-*wt* (\bullet , n=7) ou EL4-huCD20 (\blacksquare , n=7). Des souris naïves ont été injectées avec 5×10^5 EL4-*wt* (\circ , n=7) ou EL4-huCD20 cells (\square , n=7).

La protection anti-tumorale induite par l'AcM anti-CD20 s'est avérée être dépendante des cellules CD4⁺ (Figure 14). Leur déplétion a en effet conduit à une importante diminution de la

protection, au moment de la première injection tumorale mais aussi au moment de la ré-injection, plaçant ces cellules au cœur d'un possible processus vaccinal.

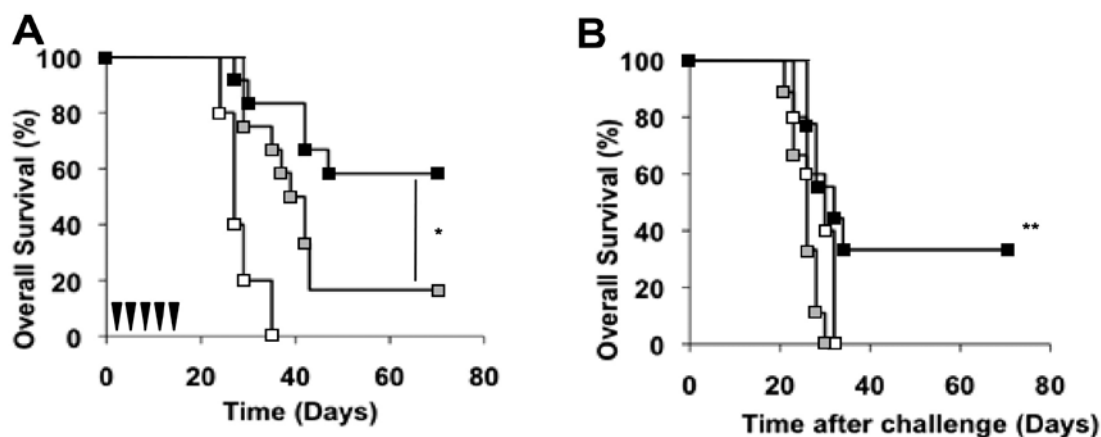


Figure 14. Les cellules CD4⁺ sont nécessaires à la protection anti-tumorale induite par l'AcM anti-CD20 CAT-13. (A) les cellules CD4⁺ ont été déplétées de souris naïves avec un AcM déplétant anti-CD4. Les souris déplétées (□, n = 12) ou non déplétées (■, n = 12) ont été injectées avec 5×10^5 EL4-huCD20 à J0 et ont reçu le traitement par l'AcM CAT-13. Des souris non traitées (□, n = 6) ont été utilisées comme contrôle. (B) Les cellules CD4⁺ de souris survivantes ont été déplétées à J69 (□ : n = 9) ou pas (■, n = 9) et ont été réinjectées avec 5×10^5 EL4-huCD20 à J70. Des souris non traitées (□, n = 5) ont été utilisées comme contrôle.

Lors de ma thèse, j'ai fait l'hypothèse que le traitement d'animaux porteurs de tumeurs CD20⁺ et traités par un anticorps anti-CD20 conduit à la protection à long terme des animaux grâce à des lymphocytes T CD4⁺ mémoires spécifiques de peptides dérivés de la molécule CD20. J'ai choisi pour cela d'utiliser le modèle murin de traitement de tumeurs CD20⁺ précédemment mis au point au laboratoire (Abès et al., 2010) afin d'en décrypter les mécanismes cellulaires et moléculaires. Ce modèle présente l'intérêt, au-delà d'être déjà mis au point, d'utiliser un anticorps disponible en grandes quantités, l'AcM CAT-13 (IgG2a, κ de souris anti-CD20 humain), qui est l'AcM à partir duquel un anticorps chimérique anti-CD20, le LFB-R603 ou ublituximab, a été développé et est actuellement testé pour le traitement de patient atteints de lymphome. Nous avons utilisé les cellules de la lignée EL4-huCD20.D3 sous-clonée au laboratoire.

Mes travaux de thèse se sont articulés autour de trois objectifs :

- **Etudier le rôle de différentes populations de lymphocytes T CD4⁺ dans l'établissement et le maintien de la protection anti-tumorale à long terme.**

La première partie de ma thèse a consisté à étudier les lymphocytes T CD4⁺ et à comprendre leur rôle dans la réponse anti-tumorale. Nous avons pour cela analysé les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ dans la rate d'animaux traités ou non, par des approches de cytométrie en flux, à différents temps après injection des cellules tumorales. Les principales expériences fonctionnelles ont consisté en des expériences de transferts adoptifs de cellules purifiées à des animaux receveurs naïfs, afin de démontrer les capacités anti-tumorales de ces cellules.

- **Evaluer l'implication de cellules de l'immunité innée (DCs et cellules NK) et le rôle de l'IL-12 et de l'IFN- γ dans la réponse anti-tumorale et l'établissement d'une protection anti-tumorale à long terme.**

Cette seconde partie a visé à étudier l'implication des cellules NK et des DCs dans la mise en place d'une protection anti-tumorale à long terme. Des analyses phénotypiques de ces cellules ont été effectuées par cytométrie en flux afin d'évaluer leur état d'activation. Leur implication dans la réponse anti-tumorale a été évaluée par des expériences *in vivo* de déplétion cellulaire et/ou de neutralisation de cytokines spécifiques comme l'IFN- γ ou l'IL-12. Enfin, leur lien avec la mise en place d'une immunité adaptative anti-tumorale a été examiné par l'analyse des compartiments lymphocytaires T CD4⁺ après déplétion des cellules NK ou neutralisation de cytokines comme l'IFN- γ ou l'IL-12.

- **Examiner si la réponse vaccinale observée peut être améliorée par des thérapies combinatoires.**

Nous avons commencé à chercher à optimiser l'effet vaccinal provoqué par l'utilisation d'un AcM anti-CD20 en combinant cette thérapie avec un traitement capable d'activer des cellules de l'immunité. Nous avons choisi d'étudier une combinaison anti-CD20 + IL-2. Une IL-2 modifiée, qui lie préférentiellement le récepteur de l'IL-2 d'affinité intermédiaire ($\beta\gamma$) essentiellement exprimé par les lymphocytes activés plutôt que le récepteur de haute affinité ($\alpha\beta\gamma$) majoritairement exprimé par les Tregs avec une moindre affinité, développée au Centre d'Immunologie Moléculaire (CIM) de La Havane (Cuba) a été utilisée. Ce traitement a été comparé à celui effectué avec une IL-2 non mutée (IL-2*wt*). La survie et la présence de compartiments lymphocytaires mémoires ont été évaluées.

Matériels et méthodes

Souris

Des souris C57Bl/6J *wt* de 7 semaines ont été achetées auprès de Charles River Laboratories (L'Abresle, France).

Cellules

Les cellules du thymome murin EL4 (EL4-*wt*) ont été achetées à l'American Type Cell Collection (Manassas, VA, Etats-Unis). Les cellules EL4 exprimant la molécule CD20 humaine (EL4-huCD20) ont été généreusement fournies par le Dr. José Golay (Ospedali Riuniti di Bergamo, Bergame, Italie) et sous-clonées au laboratoire par le Dr. Riad Abès. La stabilité et le niveau d'expression de cette molécule huCD20 à la surface des cellules EL4-huCD20 ont été vérifiés la veille de chaque expérience par immunofluorescence indirecte (LSRFortessa, BD Biosciences) avec un anticorps anti-huCD20 (CAT-13) et des fragments F(ab)₂ de chèvre anti-IgG de souris conjugué à la Phycoérythrine (PE) (SouthernBiotech, Birmingham, AL, Etats-Unis).

Anticorps anti-CD20

L'hybridome de souris CAT-13.6E12 a été acheté après du Deutsche Sammlung Von Microorganism und Zellkulturen (DSMZ ; Braunschweig, Allemagne). Il a été utilisé pour produire l'anticorps de type I anti-huCD20, CAT-13 (IgG2a, κ) en conditions BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication) comme précédemment décrit (Abès et al., 2010).

Immunothérapie anti-tumorale

Des souris C57Bl/6J immunocompétentes ont été injectées par voie intraveineuse (i.v.) dans la veine de la queue avec 2×10^5 EL4-huCD20 dans 200 μ L de tampon phosphate (« phosphate buffered saline », PBS) à J0 puis traitées par voie intrapéritonéale (i.p.) à J1, 4, 7, 10 et 13 avec 200 μ g de CAT-13 ou avec 200 μ g d'une IgG2a contrôle (BioXCell, West

Lebanon, NH, Etats-Unis) dans 200µL de PBS. Dans certaines expériences, des souris survivantes ont été réinjectées par voie i.v. dans la veine de la queue avec la même quantité de ces cellules à J65 (« rechallenge »).

Les souris ont été sacrifiées dès l'apparition de symptômes cliniques considérés comme critiques : paralysie de l'arrière-train, prostration, perte de poids, tumeur à la palpation. Les animaux ont été gardés au Centre d'Exploration Fonctionnelle (CEF) du Centre de Recherche des Cordeliers en accord avec les institutions. Toutes les expériences ont été réalisées avec l'accord (saisine) du comité d'éthique Charles Darwin et du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, selon les lois en vigueur depuis le 1^{er} janvier 2013.

Traitement avec l'IL-2*wt* et l'IL-2 mutée (IL-2 *mutein*)

Lors d'un travail préalable, nous avons déterminé l'équivalence d'activité biologique entre l'IL-2 humaine recombinante de type sauvage (IL-2*wt*) (provenant de la firme Roussel-Uclaf, Romainville, France, aujourd'hui disparue) et une IL-2 humaine recombinante mutée (IL-2 *mutein*) porteuse de 4 mutations (R38A, F42A, Y45A et E62A) diminuant l'affinité de cette cytokine pour le récepteur de haute affinité $\alpha\beta\gamma$ de l'IL-2 sans affecter son affinité pour le récepteur de l'IL-2 d'affinité intermédiaire $\beta\gamma$. Cette cytokine a été développée et testée au Centre d'Immunologie Moléculaire de La Havane, Cuba (Carmenate et al., 2013). La bioéquivalence IL-2 *wt*:IL-2 *mutein* a été déterminée grâce à des tests *in vitro* de prolifération de cellules NK et de cellules de la lignée CTLL2 (disponible dans l'équipe) et a été définie comme étant 1:10.

Pour les expériences de survie, les animaux ont été injectés avec 10µg d'IL-2*wt* ou 100µg d'IL-2 *mutein* dans 200µL de PBS par voie i.p. à J-1 et J3. A J0, les souris ont été injectées avec 2×10^5 EL4-huCD20 par voie i.v. puis traitées avec 200µg de CAT-13 ou d'un contrôle isotypique à J1, 4, 7, 10 et 13. Les animaux survivants de cette expérience ont reçu une réinjection de 4×10^5 EL4-huCD20 par voie i.v à J65.

Par ailleurs, le sang de ces animaux a été prélevé dans la veine sub-mandibulaire à J2 et J21 après injection des cellules tumorales et après rechallenge (donc à J67 et J86) dans 50µL d'héparine. Les populations immunitaires ont été marquées et évaluées par cytométrie de flux comme décrit ci-après.

Traitements avec des anticorps déplétants ou neutralisants

La déplétion des Tregs a été réalisée par l'injection par voie i.p. de 200µg d'AcM anti-CD25 (clone PC61, IgG1 de rat) dans 200µL de PBS à J-10 et J-3. La neutralisation de l'IL-12 a été obtenue par des injections de 300µg d'un AcM anti-IL-12p40 (clone C17.8, IgG2a de rat) dans 200µL de PBS à J14 et J17. Pour bloquer l'IFN-γ, les souris ont été injectées avec 250µg d'un AcM anti-IFN-γ (clone R4-6A2, IgG1 de rat) tous les 4 jours à partir de J-1. L'injection de 100µg d'anticorps polyclonaux de lapin anti-asialo-GM1 tous les 4 jours à partir de J-1 a permis la déplétion des cellules NK. Dans les groupes contrôles, un anticorps contrôle de même isotype a été injecté dans les mêmes conditions et en mêmes quantités. Tous les anticorps ont été achetés chez BioXCell, à l'exception des anticorps anti-asialo-GM1 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japon).

Transfert adoptif de cellules

Des splénocytes ont été isolés à partir de souris naïves, ou de souris porteuses de tumeur, ou de souris porteuses de tumeur et traitées avec l'AcM anti-CD20 CAT-13 à J21. Les lymphocytes T CD4⁺ ont été triés négativement par billes magnétiques (CD4⁺ T cell isolation kit II ; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne).

Pour l'expérience de transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺ mémoires, des lymphocytes T CD4⁺ ont été négativement triés à partir de la rate de souris survivantes (J65) ou de souris naïves du même âge, puis ont été marqués avec un anticorps anti-CD4-PE (GK1.5) et un anticorps anti-CD44-APC (IM7, eBiosciences, San Diego, CA, Etats-Unis). Les cellules CD4⁺ CD44⁺ ont alors été triées par cytométrie de flux (BD FACSAria III, BD Biosciences, San Jose, CA Etats-Unis). La pureté des lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes T CD4⁺ CD44⁺ a été vérifiée par cytométrie de flux avant le transfert adoptif, et l'absence de cellules dendritiques CD11c⁺ CD4⁺ dans les fractions triées a été vérifiée. 5 x 10⁶ lymphocytes T CD4⁺ et 3 x 10⁵ lymphocytes T CD4⁺ CD44⁺ respectivement ont été transférés chez des souris receveuses naïves par voie i.v. dans la veine de la queue à J-1. Les souris receveuses ainsi que des souris naïves contrôles ont reçu une injection de 2 x 10⁵ EL4-huCD20 à J0 et la survie a été suivie.

Immunofluorescence, cytométrie en flux et anticorps

Pour les expériences de phénotypage, des souris ont été injectées par voie i.v. avec 2×10^5 EL4-huCD20 puis traitées avec CAT-13 ou son contrôle isotypique. La rate ou les ganglions cervicaux, axillaires et inguinaux des souris ont été prélevés stérilement à différents temps après injection des cellules tumorales. Les cellules spléniques et ganglionnaires ont été isolées et les RFc γ qu'elles expriment saturés par incubation de 15 min en présence d'un anticorps monoclonal bloquant anti-CD16/CD32 (2.4G2). Les cellules ont été marquées directement (pour les marqueurs de surface) ou ont été préalablement stimulées *in vitro* pour la détection de cytokines intracellulaires : 2×10^6 cellules ont été mises en culture pendant 2 h à 37°C en présence d'ionomycine (5 μ g/mL) et de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (25ng/mL), et pendant 2 heures supplémentaires en présence de monensine (6.7 μ g/mL).

Les anticorps utilisés, reconnaissant des marqueurs de surface ont été les suivants: eBiosciences : anti-CD3 ϵ -APCeF780 (clone 17A2), anti-CD8 α -Alexa Fluor 660 (clone 53-6.7), anti-CD8 α -eF450 (clone 53-6.7), anti-CD11c-PE (clone N418), anti-CD62L-PE-Cy5.5 (clone MEL-14), anti-CD44-APC-Alexa750 (clone IM7), anti-CD86-APC (clone GL1). BD Biosciences : anti-CD25-FITC (clone 3C7), anti-CD45-PE-Cy7 (clone 30-F12), anti-CD45R (B220)-PerCP-Cy5.5 (clone RA3-6B2), anti-CD80-V450 (clone 1610 A.1), anti-IA/IE-FITC (clone 2G9), anti-NKp46-PerCP-Cy5.5 (clone 29A1.4). Caltag Medsystems (Buckingham, UK) : anti-CD4-PE-TexasRed (clone RM4-5).

Les anticorps utilisés, reconnaissant les molécules intracellulaires ont été les suivants : eBiosciences : anti-IL-4-PE-Cy7 (clone BVD6-24G2) et anti-IL-12p40-PerCP-Cy5.5 (clone C17.8). BD Biosciences : anti-IFN- γ -AlexaFluor 647 (clone XMG1.2). Biolegend (San Diego, CA, Etats-Unis) : anti-Foxp3-PE (clone 150D) et anti-IL-17A-AlexaFluor 700 (clone TC11-18H10.1). Les données de cytométrie en flux ont été analysées avec le logiciel Diva (BD Biosciences).

Dosages par ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Le sang des souris a été prélevé stérilement sous anesthésie gazeuse par isoflurane à différents temps après injection de la tumeur. Les sera ont été conservés à -20°C. L'IL-12p70 a été quantifiée dans ces échantillons par ELISA (Ready-Set-Go ! ELISA kits ; eBiosciences).

Analyses statistiques

Le test statistique non-paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour déterminer la différence entre les moyennes. Pour estimer les différences de survie, des courbes de Kaplan-Meier ont été produites et analysées par les tests de Log-Rank. Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel Prism (version 4.0, GraphPad, San Diego, CA, Etats-Unis). La significativité statistique a été fixée à $P < 0.05$. Toutes les expériences sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes, et sont exprimées comme une moyenne \pm s.d.

Résultats

Les parties A et B de ces résultats ont fait l'objet d'une publication (Deligne et al., 2014) qui se trouve en annexe dans ce manuscrit de thèse (Annexe III) et d'une communication orale (Annexe IV).

A- Induction d'une survie à long terme de souris porteuses de tumeurs EL4-huCD20⁺ par déplétion de Tregs ou/et traitement par anti-CD20.

Pour mener à bien nos expériences, nous avons utilisé le modèle tumoral décrit par Abès *et al.* (2010) en injectant par voie i.v. 2×10^5 cellules EL4-huCD20. Dans un premier temps, afin de vérifier leur impact sur la survie d'animaux porteurs de tumeurs, nous avons injecté un anticorps anti-CD25 conduisant à la déplétion des cellules CD25⁺ (principalement les Tregs) à J-10 et J-3 avant injection des cellules tumorales (Figure 17a). Ce traitement a induit la survie de 80% des animaux en moyenne, démontrant l'importance des Tregs dans notre système. De même, un anticorps anti-CD20 a conduit à des taux similaires de survie des animaux ; le traitement d'animaux porteurs de tumeurs avec une IgG2a contrôle n'a par contre pas modifié la survie par rapport à des souris non traitées (Figure 17b). Nous avons alors testé un éventuel effet synergique de ces deux traitements sur la survie des animaux ; des animaux ont donc reçu l'anticorps anti-CD25 et l'anticorps anti-CD20 ou les anticorps contrôles de mêmes isotypes (Figure 17c). Dans les conditions expérimentales utilisées, le pourcentage de survie n'a pas été modifié par rapport à ceux obtenus avec chacun des traitements.

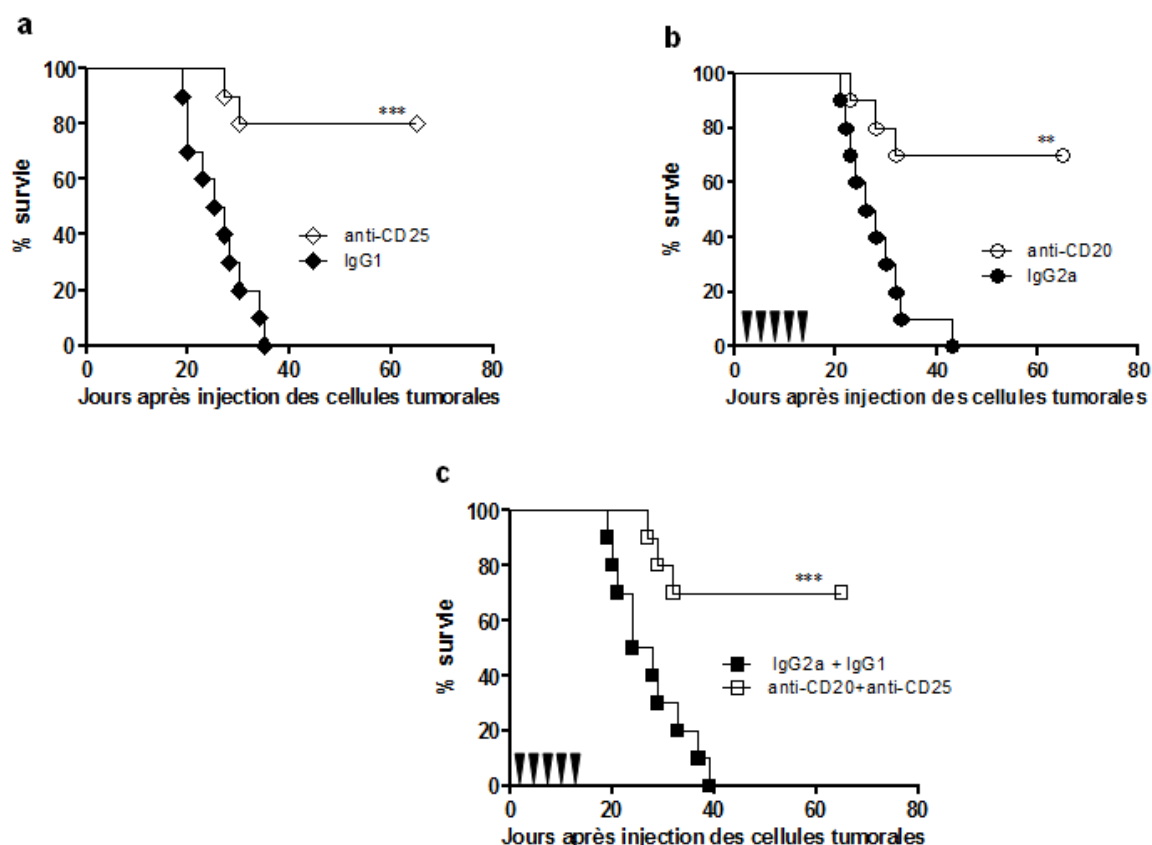


Figure 17. Induction d'une survie à long terme de souris porteuses de tumeurs EL4-huCD20 par une déplétion des Tregs et/ou un traitement par anticorps anti-CD20. (a) Des souris divisées en deux groupes ($n = 10/\text{groupe}$) ont été injectées par voie i.v. avec les cellules EL4-huCD20. Le premier groupe a reçu un anticorps anti-CD25 à J-10 et J-3 avant injection des cellules tumorales. Le second groupe a reçu le contrôle isotypique correspondant. (b) Le premier groupe a reçu l'anticorps anti-CD20 et le second groupe le contrôle isotypique. (c) Le premier groupe a reçu les traitements par anti-CD25 et anti-CD20. Le second groupe a reçu les anticorps contrôle d'isotype correspondant. Les expériences sont représentatives d'au moins deux expériences. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Les mécanismes par lesquels une thérapie par anticorps anti-CD20 peut impacter la réponse immunitaire de l'hôte dans un contexte marqué par l'émergence d'un pool fonctionnel de Tregs ont été alors explorés. Les sous-populations spléniques de lymphocytes T $CD4^+$ (Th1, Th2, Th17 et Tregs) ont été analysées à différents temps après injection des cellules tumorales (J7, J14, J21, J27 et J40) dans des souris ensuite traitées avec l'anticorps anti-CD20 ou son contrôle isotypique.

Nous avons d'abord observé que le poids des rates ainsi que le nombre total de splénocytes n'évoluaient pas dans le temps, et ce, dans aucun des deux groupes (non montré). Par contre,

le nombre absolu de Tregs augmente dans la rate de tous les animaux, qu'ils soient traités avec l'isotype contrôle ou avec l'anticorps anti-CD20, en comparaison avec des souris naïves ; cette augmentation, qui est plus faible chez les animaux traités avec l'anticorps anti-CD20, est détectée à partir de J21 après injection des cellules tumorales (Figure 18a). Une très forte différence entre les deux groupes d'animaux est observée à J27. Le nombre de Tregs retourne à un niveau basal à partir de J40 chez les souris traitées par l'anticorps anti-CD20. A l'inverse, le nombre absolu de Th1 augmente fortement chez les souris traitées par l'anticorps anti-CD20 à partir de J21 et jusqu'à J40, alors que les animaux traités par une IgG2a contrôle conservent un nombre de Th1 similaire à celui d'animaux naïfs, et ce, jusqu'à leur mort (Figure 18c). La comparaison des pourcentages relatifs de ces populations montre que l'expansion de Th1 dans le groupe traité par l'anticorps anti-CD20 surpasse considérablement la petite expansion de Tregs observée dans ce même groupe (Figure 18d). Ces résultats montrent l'existence d'un équilibre instable entre Tregs et Th1 et que le traitement par anticorps anti-CD20 est capable de modifier un contexte immunosuppresseur en le polarisant vers un phénotype Th1 anti-tumoral (des expériences de dosage nous ont d'ailleurs permis de mettre en évidence une augmentation de la production de TGF- β à partir de J21 chez les animaux traités par l'anticorps contrôle de même isotype).

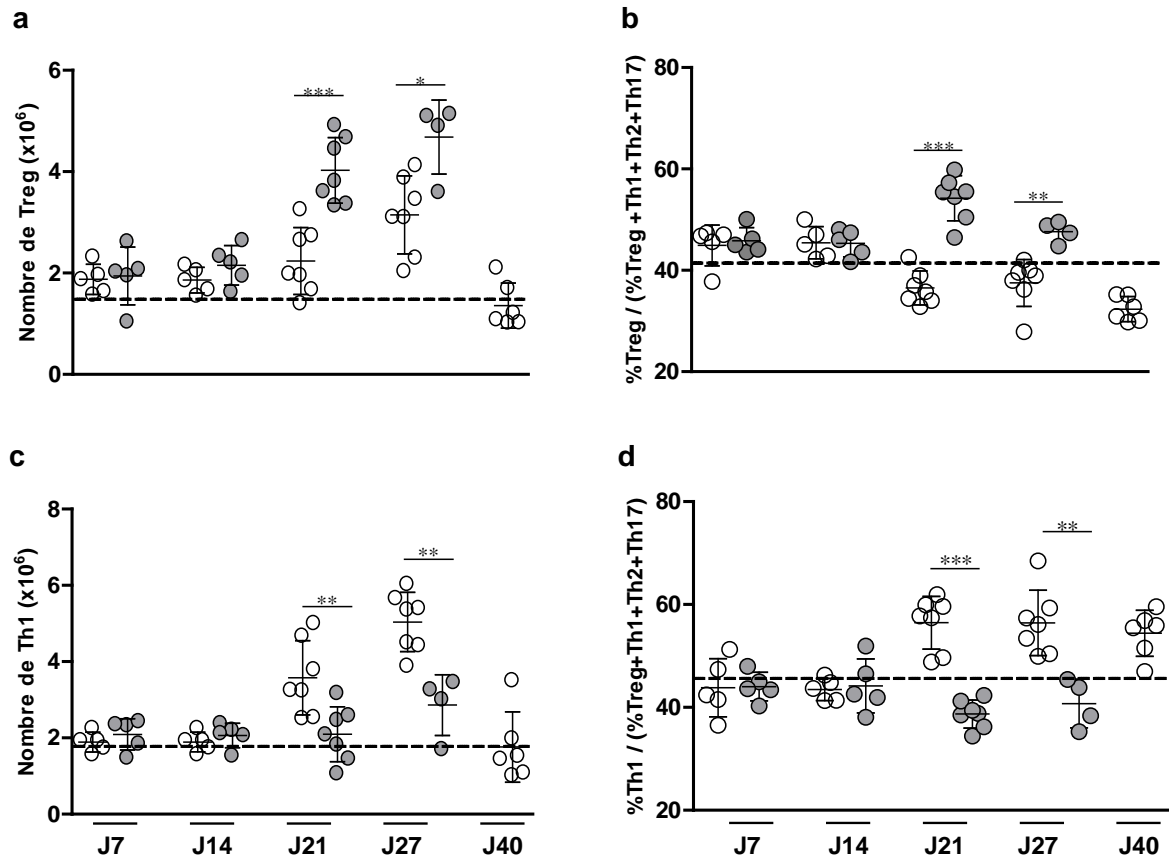


Figure 18. Analyse des Th1 et Tregs pendant et après traitement par un anticorps anti-CD20. Les rates de souris traitées par l'anticorps anti-CD20 (○) ou par une IgG2a contrôle (●) ont été collectées à différents temps après injection des cellules tumorales. Les splénocytes ont été stimulés *in vitro* comme cela est décrit dans la section Matériel et Méthodes puis analysés par cytométrie en flux. Les populations ont été définies comme suit : Tregs (CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ Foxp3⁺) (a et b) et Th1 (CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ IFN- γ ⁺) (c et d). Chaque cercle représente le nombre absolu de cellules pour une population donnée par rate (a et c) ou le pourcentage relatif de la population indiquée parmi le total (Th1+Th2+Th17+Tregs) pour un individu (b et d). Au moins 5 souris ont été analysées par temps indiqué. Les barres horizontales représentent la moyenne \pm s.d. La lignée en pointillé représente les valeurs moyennes obtenues chez 10 souris C57Bl/6 naïves du même âge pour la population indiquée. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Le nombre et le pourcentage relatif des Th2 et des Th17 n'ont pas varié dans aucun des deux groupes et à aucun moment par rapport aux souris naïves (Figure 19).

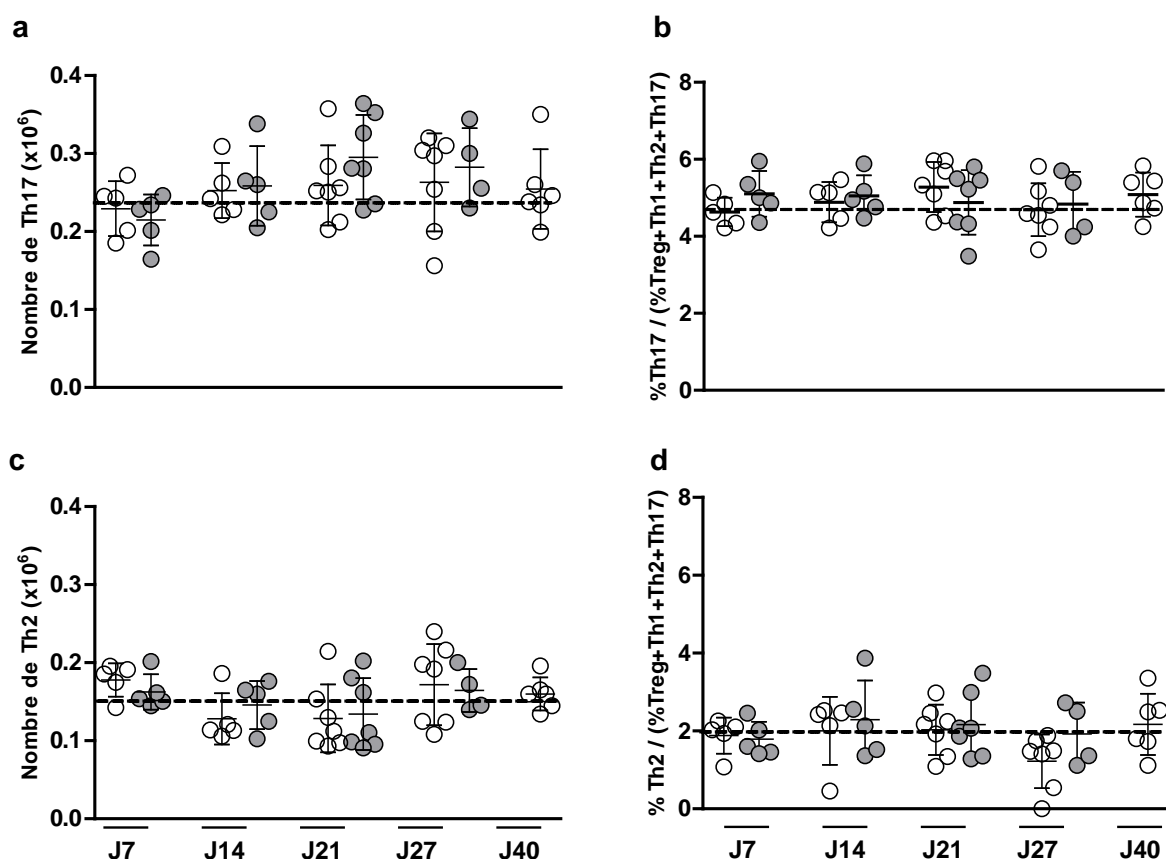


Figure 19. Analyse des Th2 et Th17 pendant et après traitement par l'anticorps anti-CD20. Les rates de souris traitées par l'anticorps anti-CD20 (○) ou une IgG2a contrôle (●) ont été collectées à différents temps après injection des cellules tumorales. Les splénocytes ont été stimulés *in vitro* comme cela est décrit dans la section Matériel et Méthodes puis analysés par cytométrie en flux. Les populations ont été définies comme suit : Th17 (CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ IL-17A⁺) (a et b) et Th2 (CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ IL-4⁺) (c et d). Les symboles sont les mêmes que ceux décrits dans la Figure 18. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

La mise en évidence de cette différence de polarisation Th1/Treg entre les groupes de souris porteuses de tumeur traitées ou non avec l'anticorps anti-CD20 nous a conduits à étudier la capacité de lymphocytes T CD4⁺ de souris traitées par l'anticorps anti-CD20 à protéger des souris naïves injectées avec la tumeur, ne recevant aucun traitement. Pour cela, des lymphocytes T CD4⁺ ont été triés à partir des rates de souris naïves, ou porteuses de tumeurs, ou porteuses de tumeur et traitées avec l'anticorps anti-CD20 (Figure 20a). Les souris ont été sacrifiées à J21, c'est à-dire au moment où l'expansion des Th1 est très forte dans le groupe traité par l'anticorps anti-CD20 au cours de la cinétique analysée et où l'expansion des Treg atteint un palier maximum dans le groupe traité avec l'isotype contrôle (Figure 18). Les lymphocytes T CD4⁺ de chaque groupe ont été injectées par voie i.v. à des souris naïves

receveuses, un jour avant l'injection des cellules EL4-huCD20. 60% des souris ayant reçu les lymphocytes T CD4⁺ du groupe traité par l'anticorps anti-CD20 ont survécu à l'injection des cellules tumorales (Figure 20b), alors que le transfert adoptif des lymphocytes T CD4⁺ de souris naïves ou porteuses de tumeur mais non traitée par l'anticorps anti-CD20 n'a pas conféré de protection aux animaux receveurs. Il est important de noter que les animaux ayant reçu les lymphocytes T CD4⁺ de souris porteuses de tumeur ont une survie plus courte que celle des souris naïves.

De plus, toutes les souris ayant résisté à l'injection tumorale après avoir reçu un transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺ de souris traitées avec l'anticorps anti-CD20 ont survécu à un réinjection de cellules tumorales 65 jours après la première injection (J65) (Figure 20c), suggérant l'existence de lymphocytes mémoires survivants à long terme parmi les lymphocytes T CD4⁺ transférés.

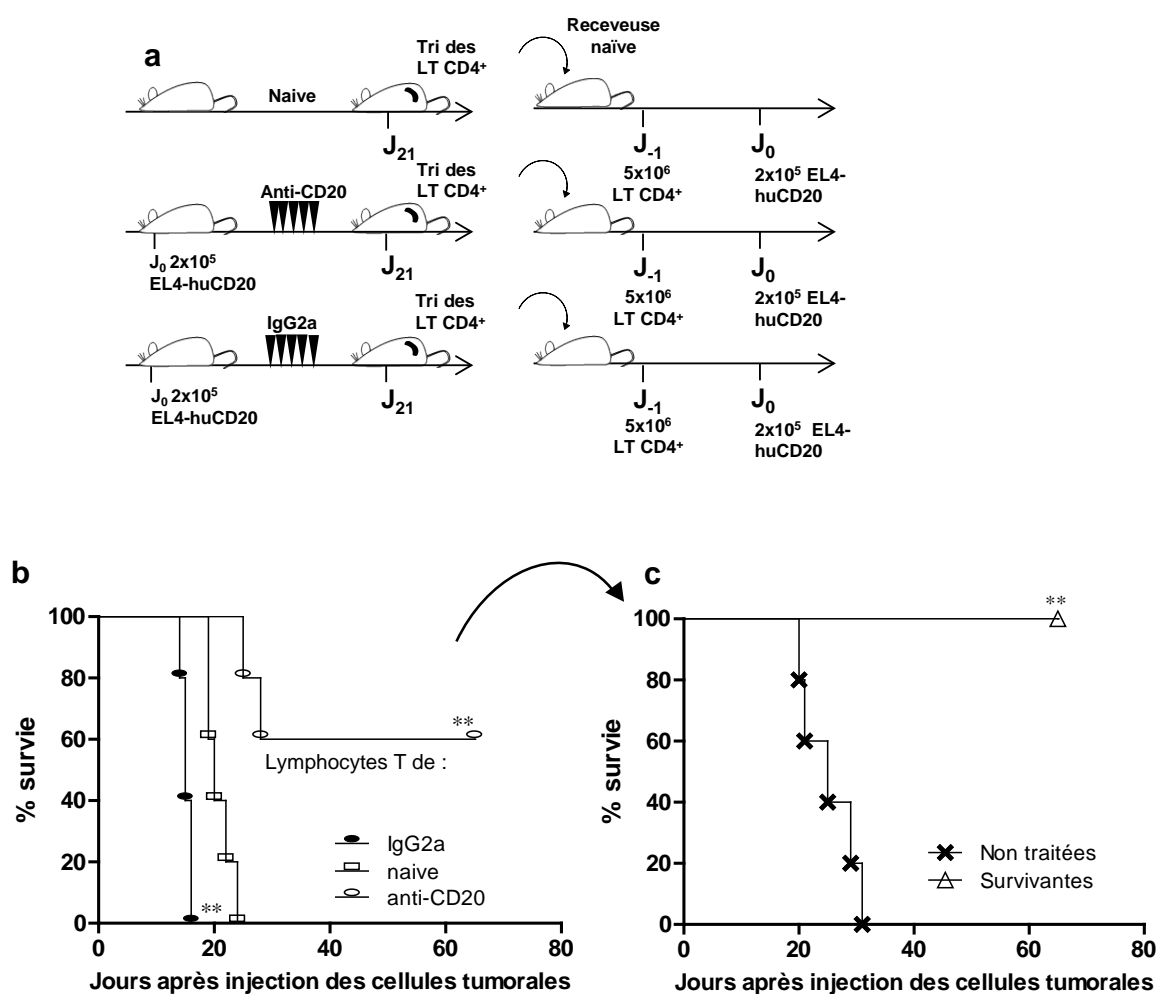


Figure 20. Des souris porteuses de tumeur sont protégées par le transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺ de souris traitées par l'AcM anti-CD20. (a) Représentation schématique du protocole de transfert adoptif présenté en (b). (b) Des rates de souris naïves, traitées par l'anticorps anti-CD20 ou par l'anticorps contrôle de même isotype ont été collectées à J21 et les lymphocytes T CD4⁺ ont été purifiés par tri magnétique négatif. Les lymphocytes T CD4⁺ ont alors été injectés à des souris naïves receveuses (5×10^6 cellules / souris dans 200 μ L de PBS) (n = 5/groupe) à J-1. A J0, toutes les souris ont reçu une injection i.v. de cellules EL4-huCD20. (c) A J65, les souris ayant survécu au transfert adoptif ont été réinjectées par voie i.v. avec le même nombre de cellules EL4-huCD20. Des souris naïves injectées avec le même nombre de cellules EL4-huCD20 ont été utilisées comme contrôle. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Ces résultats nous ont amenés à examiner la présence de cellules mémoires parmi les lymphocytes T CD4⁺ de souris traitées par l'anticorps anti-CD20. L'analyse de rates de souris survivantes à J65 a démontré un pourcentage significativement plus élevé de lymphocytes T CD4⁺ CD44^{high} CD62L^{low} effecteurs mémoires (T_{EM}) par rapport à des souris naïves du même âge (Figure 21a). L'expansion de ce pool de lymphocytes T_{EM} dans le compartiment T CD4⁺ était contrebalancée chez les souris survivantes par une baisse des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (Figure 21b).

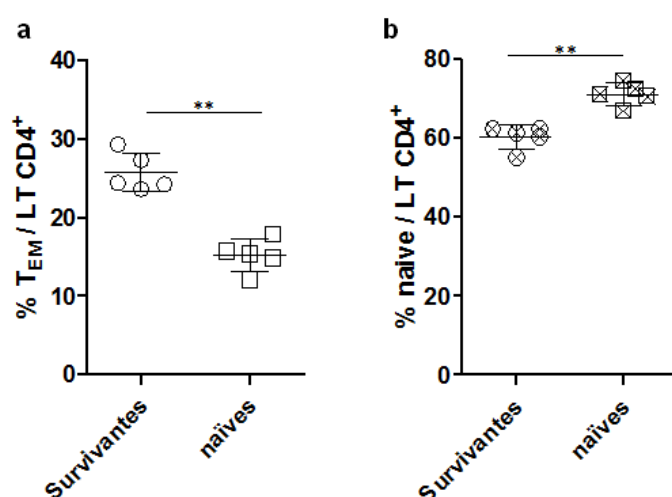


Figure 21. Les souris survivantes à long terme présentent une expansion des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs mémoires. (a) Des rates de souris survivantes à J65 traitées par l'anticorps anti-CD20 (○) et naïves (□) ont été prélevées et la présence de lymphocytes T effecteurs mémoires (T_{EM}) et naïfs a été évaluée par cytométrie en flux. Chaque cercle représente le pourcentage de CD44^{high} CD62L^{low} (T_{EM}) et de CD44^{low} CD62L^{high} (naïve) parmi les lymphocytes T CD4⁺ de chaque individu. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

De plus, nous avons également pu démontrer que ces lymphocytes T_{EM} étaient capables de se réactiver en présence des cellules tumorales. En effet, après une co-culture de 24h de cellules EL4-huCD20 avec des splénocytes de souris survivantes (prélevés à J65) ou naïves, le pourcentage de lymphocytes T_{EM} de souris survivantes traitées par l'anticorps anti-CD20, produisant de l'IFN- γ , est plus élevé que chez des souris naïves (Figure 22a). Ces cellules produisent également plus d'IFN- γ que des cellules naïves comme le montre l'intensité de fluorescence moyenne (IFM) obtenue par marquage intracellulaire de l'IFN- γ (Figure 22b), confirmant la capacité des lymphocytes T_{EM} à être réactivés en présence de cellules tumorales EL4-huCD20. Il faut également souligner que les lymphocytes T_{EM} des souris survivantes ou naïves ne produisent pas d'IFN- γ en présence de cellules EL4-*wt* (non montré), suggérant une réponse spécifique de ces cellules mémoires contre CD20.

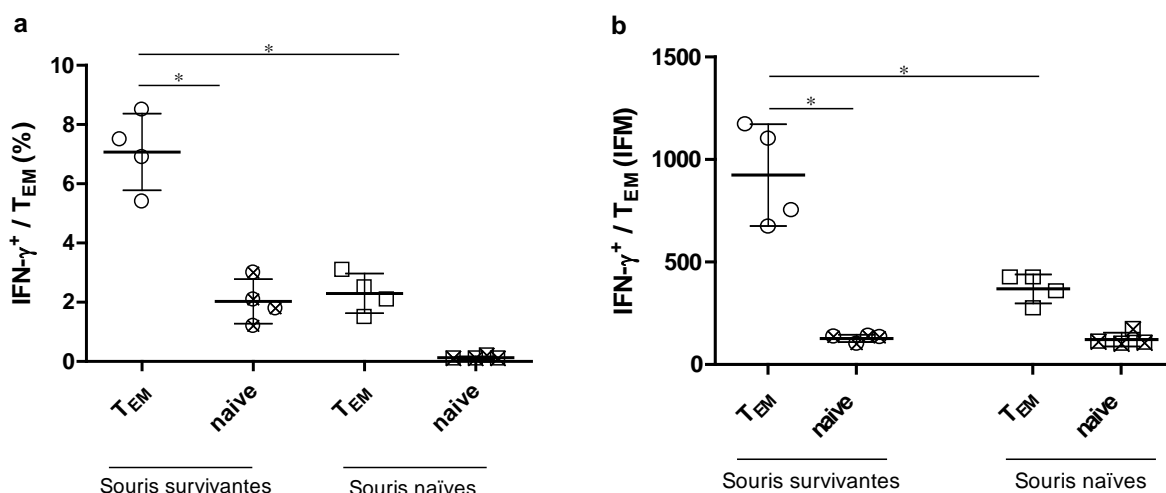


Figure 22. Les lymphocytes T_{EM} $CD4^+$ de souris survivantes produisent de l'IFN- γ en présence des cellules EL4-huCD20 *in vitro*. Des splénocytes de souris survivantes traitées par l'anticorps anti-CD20 (○) ou de souris naïves (□) ont été prélevés et mis en culture en présence de 10^5 cellules EL4-huCD20 pendant 24h à un rapport de 1:1. Le pourcentage (a) ou l'IFM (b) de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T_{EM} $CD4^+$ a été évalué par un marquage intracellulaire. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Enfin, nous avons étudié la capacité de ces lymphocytes mémoires à protéger des animaux naïfs de l'injection d'une tumeur. Des lymphocytes T $CD4^+$ $CD44^{high}$ ont été purifiés depuis

les rates de souris naïves ou survivantes à J65, et injectés à des souris naïves receveuses un jour avant l'injection de cellules EL4-huCD20 (Figure 23a). Les animaux ayant reçu des lymphocytes T $CD4^+ CD44^{high}$ de souris survivantes ayant été traitées initialement par l'anticorps anti-CD20 ont pu résister à la tumeur (Figure 23b), contrairement aux souris naïves ou ayant reçu des lymphocytes T $CD4^+ CD44^{high}$ de souris naïves, démontrant l'importance des lymphocytes mémoires dans la mise en place et le maintien de la réponse vaccinale liée à l'anticorps anti-CD20.

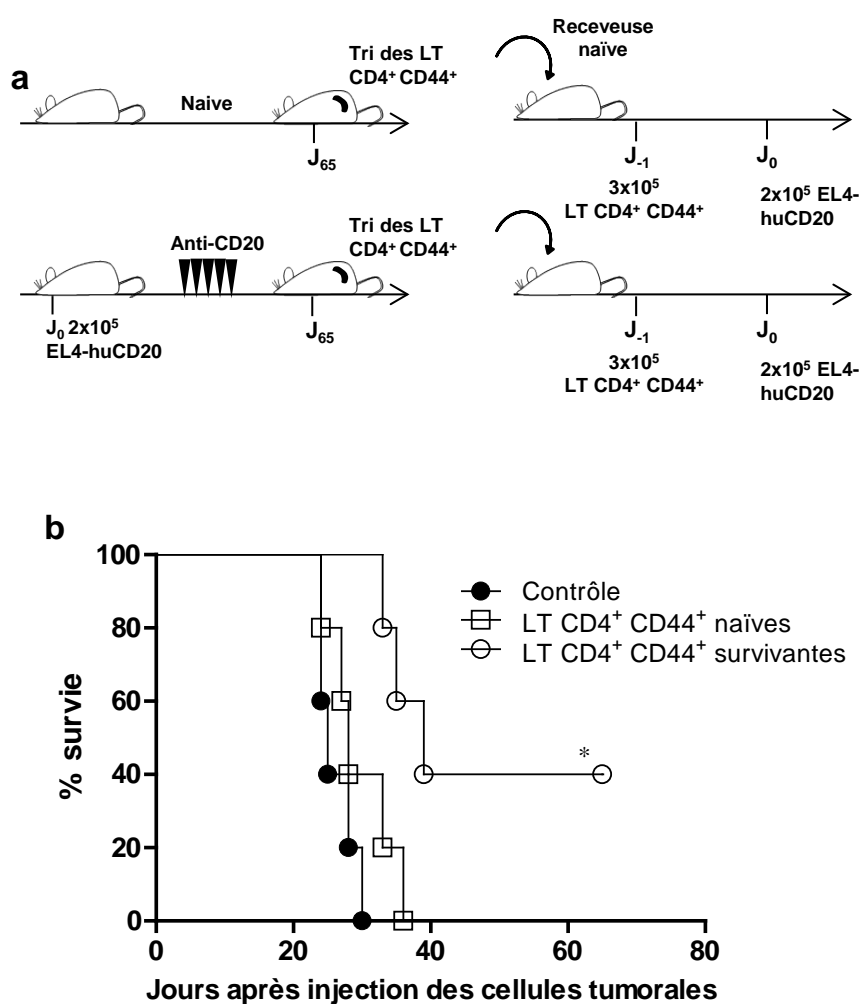


Figure 23. Le transfert adoptif de lymphocytes T $CD4^+$ mémoires confère une protection contre la tumeur à des animaux naïfs. (a) Représentation schématique du protocole de transfert adoptif utilisé en (b). (b) Des rates de souris naïves ou survivantes après traitement par l'anticorps anti-CD20 ont été prélevées à J65. Les lymphocytes T $CD4^+ CD44^{high}$ ont été triés par cytométrie en flux après enrichissement en lymphocytes T $CD4^+$ par tri magnétique négatif. Les lymphocytes T $CD4^+ CD44^{high}$ ont été injectées par voie i.v. à des souris naïves receveuses (3×10^5 cellules dans 200 μ L de PBS par souris) ($n = 5$ /groupe) à J-1. A J0, toutes

les souris ont reçu une injection i.v. de cellules EL4-huCD20. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

B- La mise en place de la réponse immunitaire adaptative anti-tumorale est dépendante des cellules NK et des DCs.

Pour décrypter les mécanismes de l'immunité innée à l'origine de la mise en place et du maintien d'une telle réponse vaccinale associée au traitement par anticorps anti-CD20, nous avons d'abord étudié l'IL-12, une cytokine décrite pour son rôle dans la différenciation de lymphocytes T $CD4^+$ naïfs en Th1. L'analyse des concentrations sériques d'IL-12p70 a montré que celles-ci étaient augmentées chez les animaux traités par l'anticorps anti-CD20 à partir de J14 et jusqu'à J27, par rapport aux animaux n'ayant pas reçu de traitement, chez lesquels les niveaux d'IL-12p70 étaient nuls ou à la limite de détection (Figure 24), suggérant que l'anticorps anti-CD20 est à l'origine de la sécrétion d'IL-12.

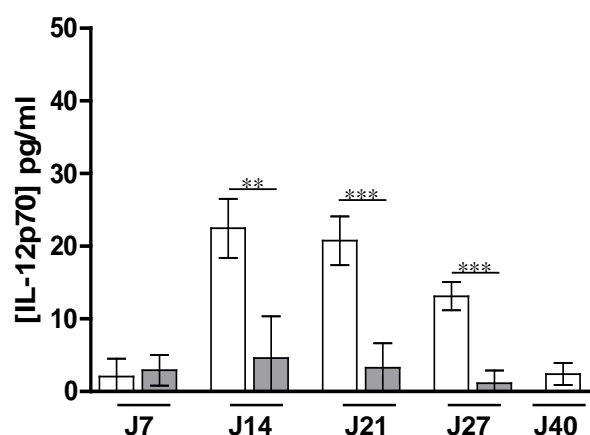


Figure 24. L'IL-12 sérique est augmentée chez les animaux ayant reçu le traitement par l'anticorps anti-CD20. Les concentrations sériques des souris porteuses de tumeur et traitées par l'anticorps anti-CD20 (histogrammes blancs) ou l'anticorps contrôle de même isotype (histogrammes gris) ont été déterminées par ELISA.

Afin de déterminer l'impact de l'IL-12 sur la polarisation des lymphocytes, nous avons alors utilisé un anticorps neutralisant anti-IL-12, anticorps qui a été injecté à J14 et J17, c'est-à-dire quelques jours avant que la polarisation Treg ou Th1 ne devienne détectable (Figure 18) chez des souris porteuses de tumeurs et traitées avec l'anticorps anti-CD20. Des travaux préliminaires nous avaient permis de démontrer que l'injection de cet anticorps anti-IL-12

induisait une importante baisse de la concentration d'IL-12 circulante à J21 chez des souris traitées par l'anticorps anti-CD20 par rapport à des animaux n'ayant pas reçu cet anticorps neutralisant (non montré).

A J21, le nombre absolu et le pourcentage relatif de Th1 de souris traitées avec l'anticorps anti-CD20 et l'anticorps anti-IL-12 étaient fortement diminués par rapport à des animaux n'ayant reçu que l'anticorps anti-CD20 (Figure 25a). Alors que les compartiments Tregs et Th2 sont peu affectés par la neutralisation de l'IL-12 (Figure 25b et d), une expansion des Th17 associée à la neutralisation de cette cytokine est observée (Figure 25c). Ces résultats suggèrent d'une part que le blocage de l'IL-12 inhibe le développement d'une réponse immunitaire Th1 chez les animaux porteurs de tumeur et traités par l'anticorps anti-CD20, et, d'autre part, favorise le développement d'une réponse de type inflammatoire associée aux Th17 dans un contexte tumoral.

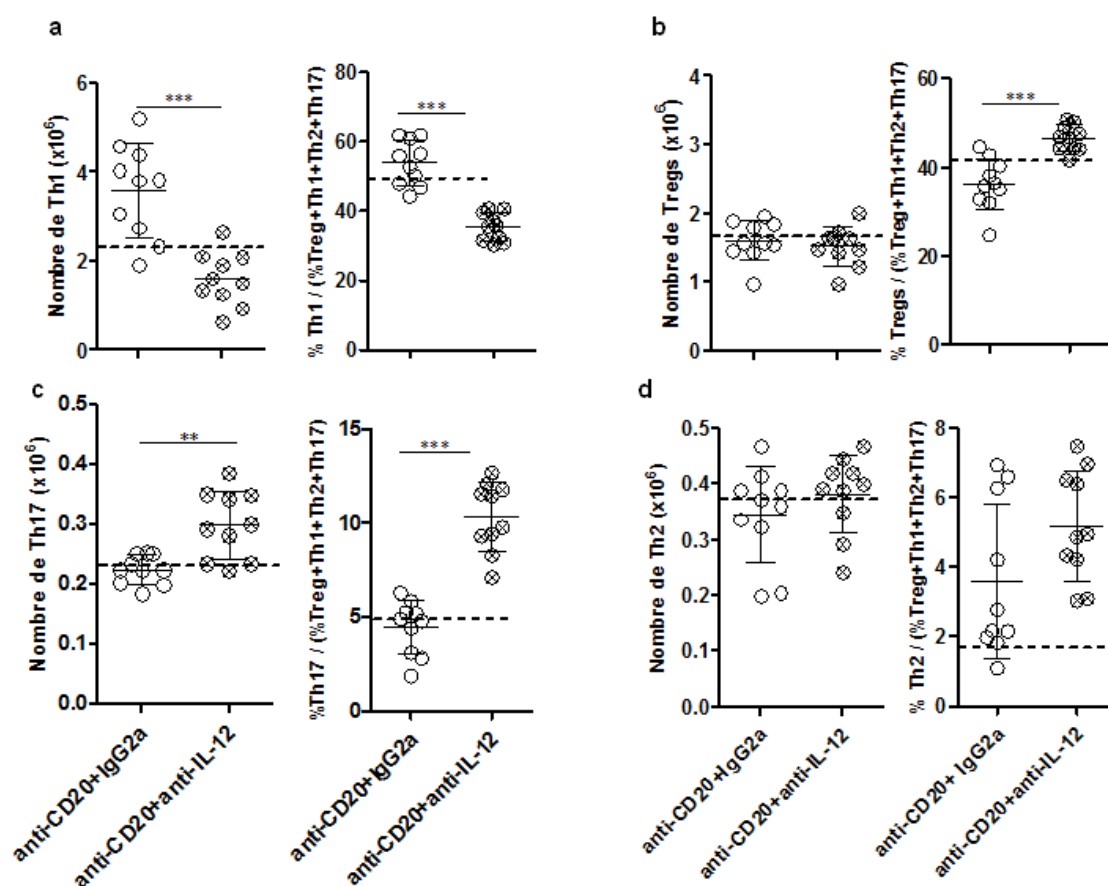


Figure 25. La différenciation des Th1 liée au traitement par l'anticorps anti-CD20 est dépendante de l'IL-12. Des souris ayant reçu une injection i.v. de cellules EL4-huCD20, ont

été traitées par l'anticorps anti-CD20 et divisées en deux groupes : le premier groupe (⊗) a reçu un anticorps neutralisant anti-IL-12p40 à J14 et J17 ; le second groupe (○) a reçu un anticorps contrôle de même isotype. A J21, les souris ont été sacrifiées et les rates collectées. Les populations Th1, Th2, Th17 et Tregs ont été analysées. Les symboles sont identiques à ceux de la Figure 18. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Les DCs étant la source cellulaire principale d'IL-12, nous avons émis l'hypothèse que ces cellules sont à l'origine de la différenciation de lymphocytes T spécifiques en Th1. Dans un premier temps, nous avons étudié l'activation des DCs spléniques chez des souris traitées par l'anticorps anti-CD20, mais aucun changement n'a été observé par rapport à des souris naïves (non montré). Puisque les DCs migrent vers les ganglions lymphatiques pour activer localement la réponse immunitaire T, nous avons alors analysé les mDCs (cellules dendritiques myéloïdes) de différents ganglions lymphatiques. Notre modèle ne nous permettant pas d'avoir directement accès aux ganglions drainants de la tumeur, nous avons choisi de prélever les ganglions cervicaux, axillaires et inguinaux de souris porteuses de tumeurs et traitées ou non avec l'anticorps anti-CD20, à différents temps après injection de la tumeur (J2, J5, J8, J14 et J21). Une augmentation du pourcentage de mDCs dans les deux groupes par rapport à des souris naïves a été mise en évidence (Figure 26a), suggérant que, dans les deux situations, une réponse immunitaire anti-tumorale se met en place. Cependant, il faut souligner que le nombre absolu de mDCs est significativement plus élevé chez les souris ayant reçu le traitement par anti-CD20 de J5 à J14 (Figure 26b).

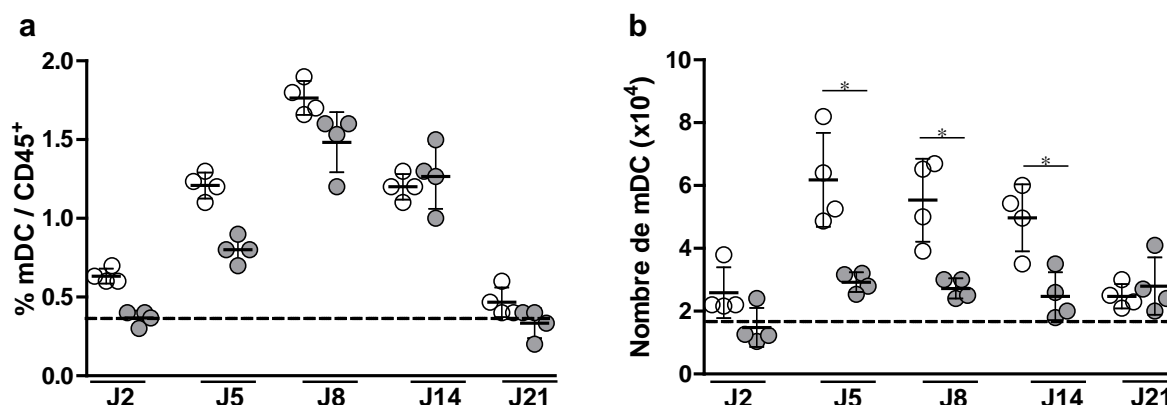


Figure 26. Le traitement par l'anticorps anti-CD20 est associé à une expansion des mDCs. Les ganglions lymphatiques cervicaux, axillaires et inguinaux de souris traitées par anti-CD20 (○) ou par un anticorps contrôle de même isotype (⊗) ont été prélevés et poolés à

différents temps après injection des cellules tumorales (J2, J5, J8, J14 et J21). Les mDCs sont définies comme étant $CD11b^+ CD11c^{high} MHCII^+ B220^-$ et ont été analysées par cytométrie de flux après marquage. Elles sont représentées en pourcentage de mDCs parmi les cellules $CD45^+$ (a) ou en nombre absolu (b). Les symboles sont identiques à ceux de la Figure 18. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

Nous avons également mis en évidence que les DCs ganglionnaires de souris traitées par l'anticorps anti-CD20 exprimaient les marqueurs de co-stimulation CD80 (bien que cette molécule soit considérée par certains comme un régulateur négatif des lymphocytes T (Herbst et al., 2014)) et CD86 huit jours après injection de la tumeur (J8) (Figure 27), contrairement au groupe contrôle.

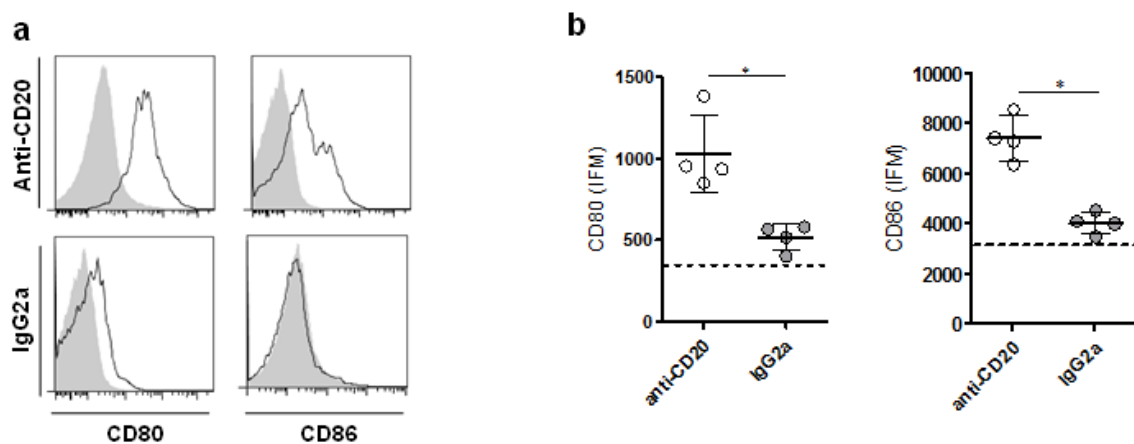


Figure 27. Les mDCs sont activées par le traitement par l'anticorps anti-CD20. (a) Expression de l'IFM de CD80 et CD86 chez les souris traitées par un anticorps contrôle de même isotype (panneaux du haut) ou par l'anticorps anti-CD20 (panneaux du bas) en comparaison avec une souris naïve (histogramme plein) à J8. (b) Représentation des valeurs d'IFM pour chaque animal des groupes de souris traitées par l'anticorps anti-CD20 (○) ou l'anticorps contrôle de même isotype (●). Les symboles sont identiques à ceux de la Figure 18. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

De même, les mDCs des souris traitées par l'anticorps anti-CD20 présentent une très forte expression de surface des molécules de classe II du CMH, à J8 en particulier, c'est-à-dire le jour où l'expression des molécules de co-stimulation a été détectée (Figure 28). Les souris n'ayant pas été traitées avec l'anticorps anti-CD20 ont également une expression des molécules de classe II du CMH plus élevée que celle des souris naïves, ce qui est consistant

avec une prolifération des mDCs dans ce groupe (Figure 26a). L'ensemble de ces résultats suggère une activation des mDCs après injection de l'anticorps anti-CD20, et nous a conduits à étudier la production d'IL-12 par ces cellules.

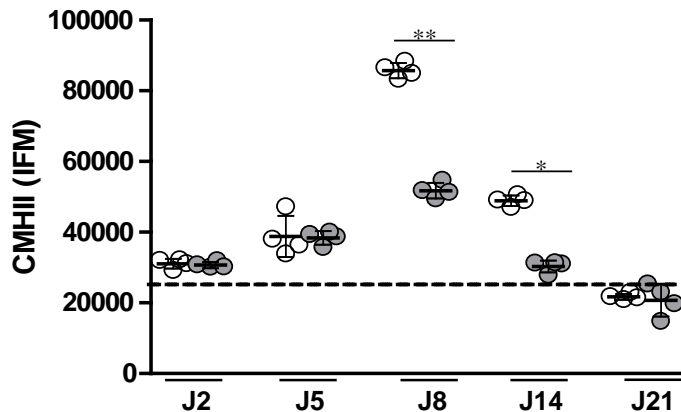


Figure 28. Après traitement par l'anticorps anti-CD20, les mDCs expriment fortement les molécules de classe II du CMH. Expression des molécules de classe II du CMH en IFM par les mDCs de souris ayant été traitées par l'anticorps anti-CD20 (○) ou non (●), à différents temps. Les symboles sont identiques à ceux de la Figure 18. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Un marquage intracellulaire a montré que les mDCs de souris traitées par l'anticorps anti-CD20 contiennent de plus grandes quantités d'IL-12 de J8 à J21 (Figure 29), démontrant que le traitement par l'anticorps anti-CD20 induit le développement d'une immunité anti-tumorale associée au recrutement de mDCs activées et productrices d'IL-12 dans les ganglions lymphatiques.

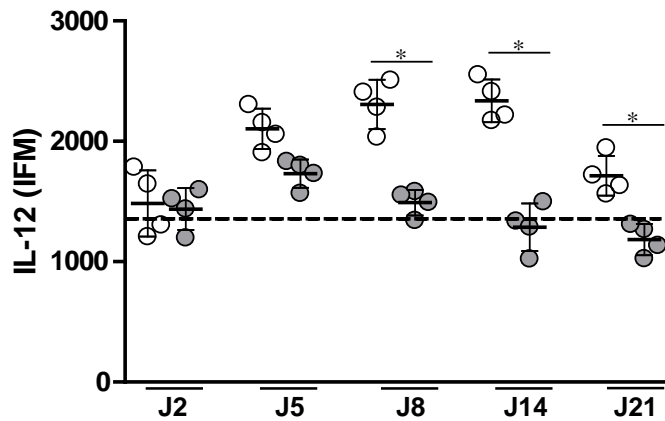


Figure 29. L'activation des mDCs de souris traitées par l'anticorps anti-CD20 est associée à une production d'IL-12. Marquage intracellulaire du contenu en IL-12p40 des mDCs ganglionnaires de souris traitées par l'anticorps anti-CD20 (○) ou non (●), à différents temps. Les symboles sont identiques à ceux de la Figure 18. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

L'IFN- γ est une cytokine dont le rôle anti-tumoral est très largement documenté et qui est impliquée dans la fonction des lymphocytes Th1. Nous avons par conséquent étudié dans quelle mesure l'induction de cette immunité protectrice à long terme liée au traitement par l'anticorps anti-CD20 et l'équilibre Th1/Tregs étaient dépendants de l'IFN- γ . Nous avons utilisé un anticorps neutralisant anti-IFN- γ dont l'injection régulière avant et après l'injection des cellules tumorales a provoqué une diminution du pourcentage de survie des animaux traités par l'anticorps anti-CD20 (Figure 30).

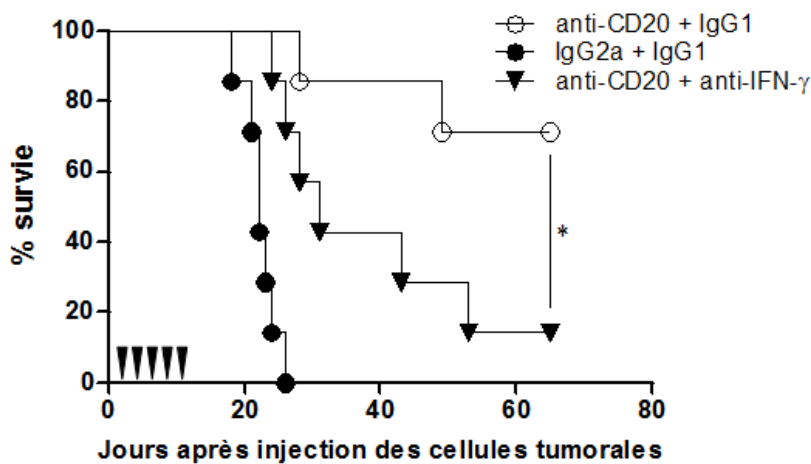


Figure 30. La neutralisation de l'IFN- γ diminue la survie d'animaux porteurs de tumeurs et traités par l'anticorps anti-CD20. Des souris ont été injectées avec les cellules EL4-huCD20 et divisées en 3 groupes (n = 7 /groupe). Les animaux du premier groupe ont reçu le traitement par l'anticorps anti-CD20 et l'anticorps contrôle de même isotype que l'anticorps neutralisant anti-IFN- γ . Les animaux du second groupe ont reçu le traitement par l'anticorps anti-IFN- γ tous les 4 jours à partir de J-1 et l'anticorps contrôle de même isotype que l'anticorps anti-CD20. Les animaux du troisième groupe ont reçu les deux anticorps contrôles. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Nous avons alors étudié l'impact de la neutralisation de l'IFN- γ sur la polarisation Th1 induite par l'anticorps anti-CD20. Le nombre et le pourcentage relatif de Th1 sont fortement diminués (Figure 31b) à J21, sans que cela n'ait d'impact sur les compartiments Th2, Th17 et Tregs (Figure 31a, c et d), suggérant que la polarisation Th1 est liée à la production d'IFN- γ .

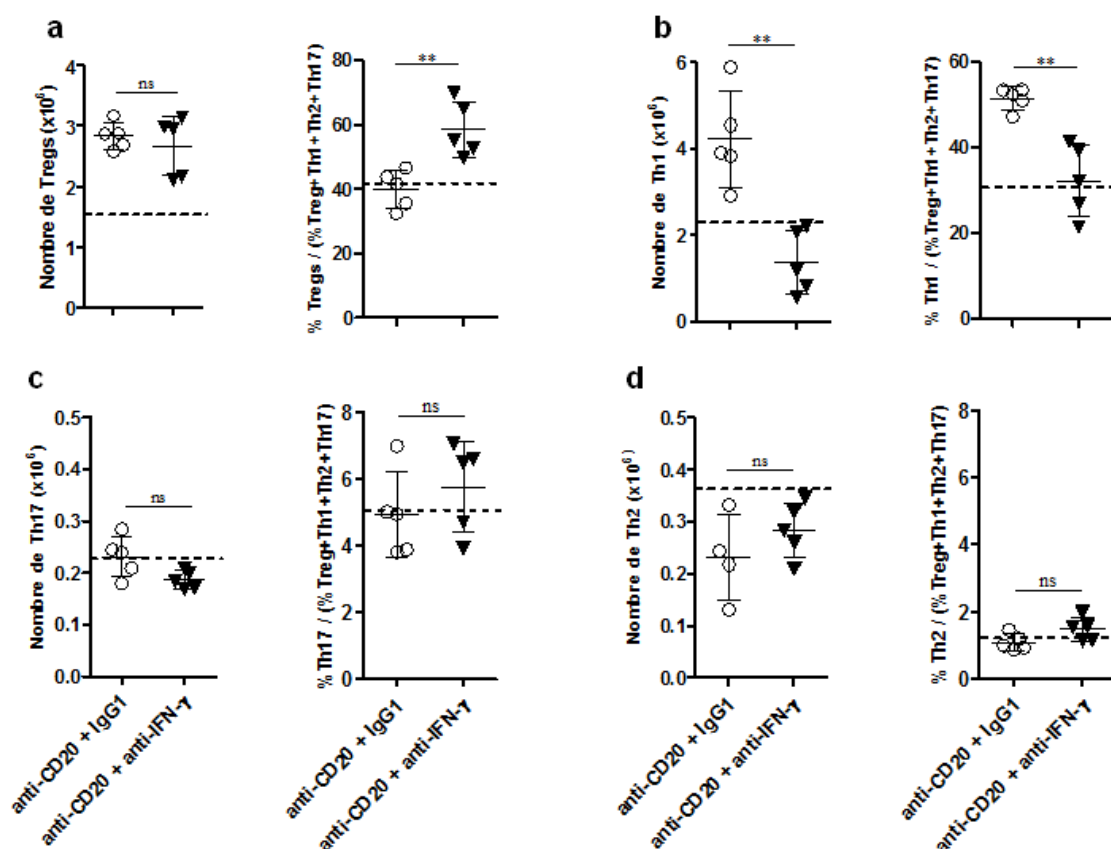


Figure 31. La neutralisation de l'IFN- γ limite l'expansion des Th1 induite par le traitement par l'anticorps anti-CD20. Des souris ont été injectées par voie i.v. avec les cellules EL4-huCD20. Les animaux du premier groupe (▼) ont reçu un anticorps anti-IFN- γ tous les quatre jours depuis J-1, ainsi que l'anticorps anti-CD20 ; les animaux du second

groupe (○) a reçu l'anticorps anti-CD20 et un anticorps contrôle de même isotype que l'anticorps anti-IFN- γ . A J21, les souris ont été sacrifiées et les rates collectées. Les compartiments Th1, Th2, Th17 et Treg ont été évalués. Chaque cercle représente le nombre absolu de cellules pour une population donnée par rate (panneaux de gauche) ou le pourcentage relatif de la population indiquée parmi le total (Th1+Th2+Th17+Tregs) pour un individu (panneaux de droite). Les symboles sont identiques à ceux de la Figure 18. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

L'activation des mDCs chez les souris traitées par l'anticorps anti-CD20 (Figures 26-29) et la description du dialogue (« cross-talk ») entre DCs et cellules NK pour stimuler une immunité T spécifique d'un antigène (Lee et al., 2011) nous ont alors conduits à analyser les cellules NK durant le traitement par l'anticorps anti-CD20. Une expansion du pourcentage de cellules NK parmi les leucocytes dans la rate de souris porteuses de tumeur et traitées avec l'anticorps anti-CD20 a été observée, de J14 à J27 (Figure 32a). A l'inverse, les souris du groupe non traité par l'anticorps anti-CD20 ne présentent aucune expansion de ce compartiment, et montrent même un pourcentage plus faible que celui observé chez des souris naïves à J21. De même, le contenu en IFN- γ des cellules NK à J21 est significativement plus élevé chez les souris ayant reçu le traitement par l'anticorps anti-CD20, à la fois en intensité de fluorescence et en pourcentages (Figure 32b).

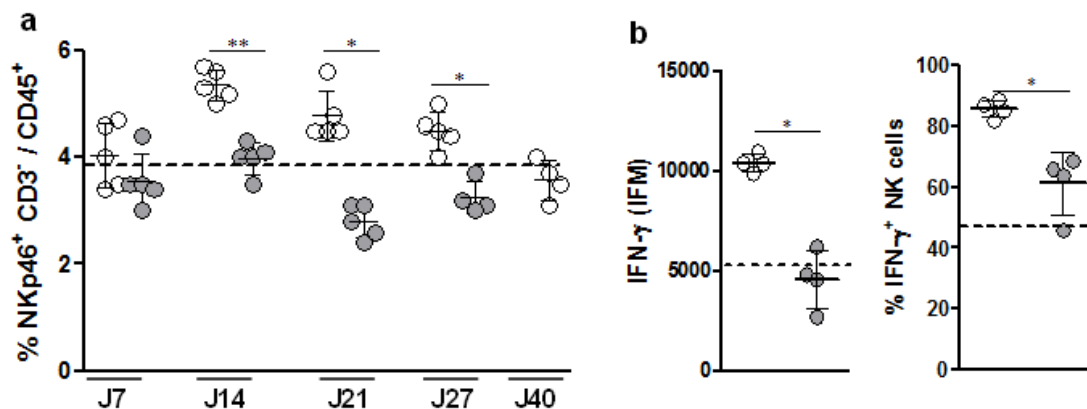


Figure 32. Activation des cellules NK suite au traitement par l'anticorps anti-CD20. (a) Les rates de souris traitées par l'anticorps anti-CD20 (○) ou l'anticorps contrôle de même isotype (●) ont été collectées à différents temps après injection des cellules tumorales. Les cellules NK (NKp46⁺ CD3⁻) ont été détectées par immunofluorescence et cytométrie de flux. (b) Les rates de souris traitées par l'anticorps anti-CD20 ou par l'anticorps contrôle de même isotype ont été collectées à J21. La présence intracellulaire d'IFN- γ dans les cellules NK a été

évaluée par immunofluorescence intracellulaire et cytométrie de flux. Les symboles sont identiques à ceux de la Figure 18. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

Par ailleurs, nous avons aussi démontré que la déplétion des cellules NK avec des anticorps anti-asialo-GM1 diminuait significativement la survie des animaux traités avec l'anticorps anti-CD20 (Figure 33), démontrant la nécessité de la présence de cette population cellulaire dans le développement d'une réponse immunitaire induite par le traitement par anticorps anti-CD20.

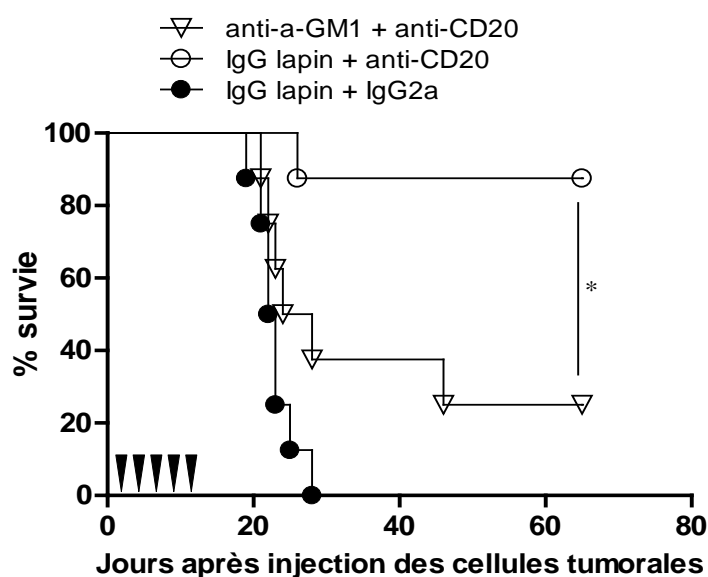


Figure 33. Les cellules NK sont nécessaires à la survie des animaux traités par l'anticorps anti-CD20. Des souris ont été injectées en i.v. avec des cellules EL4-huCD20 et divisées en deux groupes (n= 8 souris/groupe). Les souris du premier groupe ont reçu un anticorps anti-CD20 et des anticorps polyclonaux de lapin servant de contrôle isotypique. Les souris du second groupe ont reçu des anticorps anti-asialo-GM1 tous les 4 jours à partir de J-1 et un anticorps contrôle de même isotype que l'anticorps anti-CD20. Les souris du troisième groupe ont reçu les deux contrôles isotypiques. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

La déplétion des cellules NK impacte également l'augmentation de Th1 induite par le traitement par l'anticorps anti-CD20 (Figure 34a) à J21, bien que cette inhibition soit moins importante que celle obtenue lors de la neutralisation de l'IFN- γ (Figure 31b). Comme cela avait déjà été observé avec la neutralisation de l'IL-12, une augmentation du nombre absolu et

du pourcentage relatif de Th17 a été observée dans cette situation (Figure 34d). Les populations Th2 et Treg n'ont par contre pas été modifiées (Figure 34b et c).

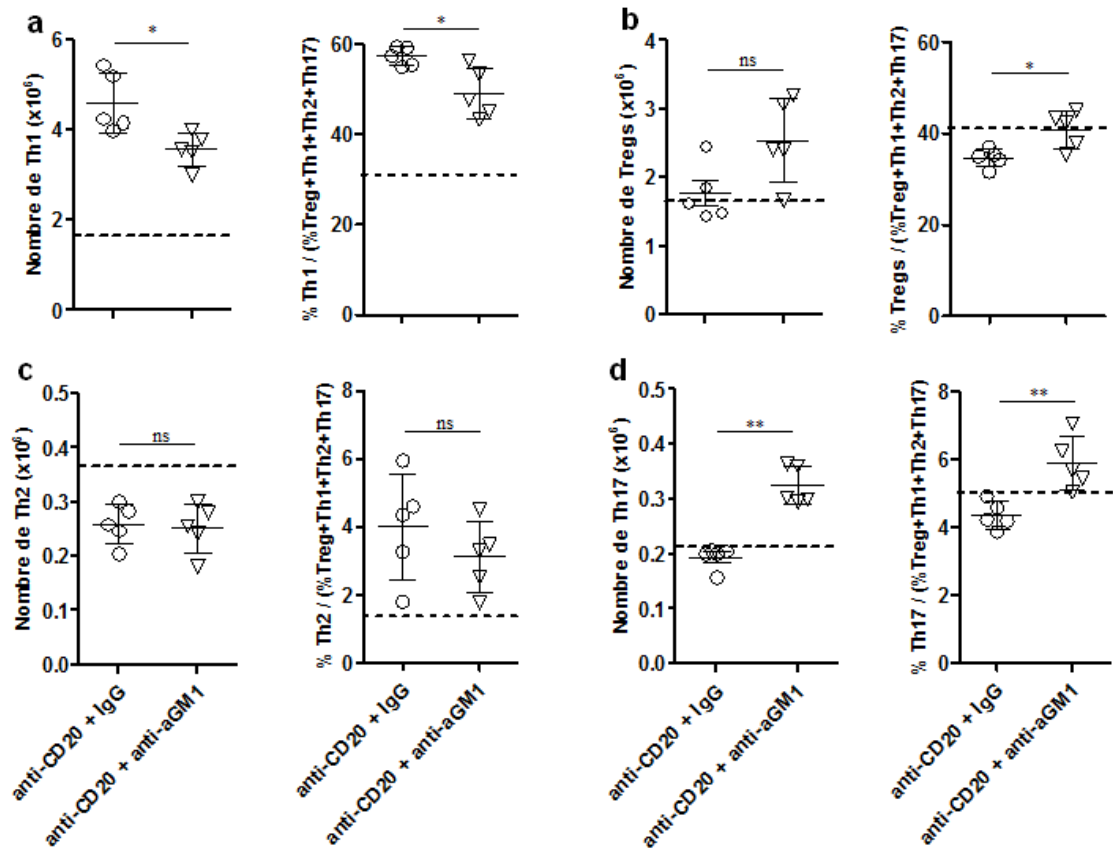


Figure 34. Les cellules NK sont nécessaires à la polarisation Th1 induite par le traitement par l'anticorps anti-CD20. Des souris ont été injectées avec des cellules EL4-huCD20. Les souris du premier groupe (▽) ont reçu des anticorps anti-asialo-GM1 tous les 4 jours à partir de J-1 ainsi que l'anticorps anti-CD20, alors que les souris du second groupe (○) ont reçu des anticorps polyclonaux de lapin servant de contrôle isotypique, ainsi que l'anticorps anti-CD20. A J21, les souris ont été sacrifiées et les rates collectées. Les compartiments Th1, Th2, Th17 et Treg ont été évalués. Chaque cercle représente le nombre absolu de cellules pour une population donnée par rate (panneaux de gauche) ou le pourcentage relatif de la population indiquée parmi le total (Th1+Th2+Th17+Tregs) pour un individu (panneaux de droite). Les symboles sont identiques à ceux de la Figure 18. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

En conclusion, nous avons démontré que la production d'IFN- γ et les cellules NK sont nécessaires à la polarisation Th1 induite par l'anticorps anti-CD20 et à la survie des animaux.

C- L'effet vaccinal de l'anticorps anti-CD20 peut être amélioré grâce à une combinaison thérapeutique avec une IL-2 modifiée.

L'ensemble de cette étude nous a poussés à explorer l'intérêt de thérapies combinatoires afin d'améliorer l'effet vaccinal de l'anticorps anti-CD20 sur les lymphocytes T CD4⁺, mais aussi sur les lymphocytes T CD8⁺, dont la présence est indispensable lors de la réinjection des cellules tumorales aux animaux survivants à long terme (Abès et al., 2010). Notre choix s'est porté sur l'IL-2 et un variant d'IL-2 disponible dans le laboratoire ; en effet, le laboratoire avait montré antérieurement que le taux de survie de souris ayant reçu des cellules tumorales EL4-huCD20, traitées par l'anticorps anti-CD20 et recevant de l'IL-2 de façon concomitante n'était pas différent de celui de souris traitées uniquement par l'anticorps anti-CD20 (Abès et al., 2010). Cette absence d'effet de l'IL-2 pourrait être due au fait que cette cytokine permet de recruter le compartiment Tregs et de ne renforcer que modérément le compartiment Th1 induit par le traitement par l'anticorps anti-CD20. Nous avons donc comparé l'activité de l'IL-2 *wt* avec celle d'une IL-2 mutée appelée IL-2 *mutein*. Cette dernière se fixe plus faiblement au récepteur de haute affinité du récepteur de l'IL-2 ($\alpha\beta\gamma$) fortement exprimé par les Tregs (Carmenate et al., 2013) et pourrait donc, contrairement à l'IL-2 *wt*, renforcer le compartiment Th1 induit par le traitement par l'anticorps anti-CD20 sans, cette fois, activer significativement le compartiment Tregs. Des souris ont donc reçu des cellules EL4-huCD20 et ont été divisées en quatre groupes. Les animaux du premier groupe ont été traités seulement par l'anticorps anti-CD20 ; les animaux du second groupe ont reçu de l'IL-2 *wt*, ceux du troisième groupe de l'IL-2 *mutein*, en plus du traitement par l'anticorps anti-CD20. Les animaux du quatrième groupe ont reçu un anticorps contrôle de même isotype que l'anticorps anti-CD20. En comparaison avec les animaux ayant reçu l'anticorps anti-CD20 seul ou associé avec l'IL-2 *wt* (environ 70% de survie), 95% des animaux ayant reçu l'IL-2 *mutein* en combinaison avec l'anticorps anti-CD20 ont survécu (Figure 35a). Afin d'évaluer l'impact à long terme de ce type de traitement, les animaux survivants de ces trois groupes ont été réinjectés avec une dose deux fois plus importante de cellules tumorales ; les souris ayant reçu la thérapie combinatoire anti-CD20 et IL-2 *mutein* ont alors présenté un temps de survie accru par rapport aux animaux des deux autres groupes (Figure 35b). Cependant, les pourcentages de survie finaux sont similaires (Figure 35b).

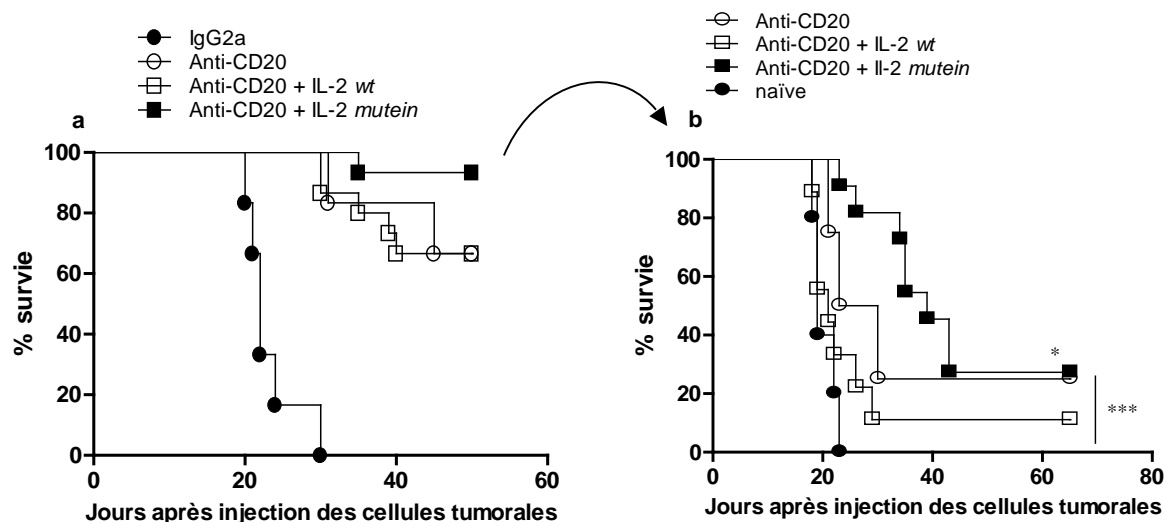


Figure 35. Amélioration de la survie à long terme d'animaux porteurs de tumeur et traités avec un anticorps anti-CD20 par un variant d'IL-2. (a) Des souris ont été injectées par voie i.v. avec des cellules EL4-huCD20 et séparées en 4 groupes (n= 15 souris/groupe). Les animaux des deux premiers groupes ont reçu un traitement par anticorps anti-CD20 et deux injections d'IL-2 wt ou d'IL-2 *mutein* (10µg d'IL-2 bioactive dans 200µL de PBS par injection) à J-1 et J3. Ceux du troisième groupe ont reçu le traitement par anticorps anti-CD20 et les souris du quatrième groupe l'anticorps contrôle de même isotype que l'anticorps anti-CD20. (b) A J65, les souris ayant survécu à la tumeur ont été réinjectées par voie i.v. avec une quantité de cellules EL4-huCD20 deux fois plus importante (4×10^5 cellules). Des souris naïves (n = 5) injectées avec le même nombre de cellules EL4-huCD20 ont été utilisées comme contrôle. Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Nous avons également analysé l'effet de l'addition d'IL-2 *mutein* sur l'activation des lymphocytes T anti-tumoraux. L'analyse des compartiments Treg et des Th1 est en cours. Le devenir des populations lymphocytaires mémoires dans le sang des animaux porteurs de tumeur et traités avec l'anticorps anti-CD20 et l'IL-2 wt ou l'IL-2 *mutein* a été évalué. Une expansion de lymphocytes $T_{EM} CD4^+$ dans le sang des animaux des deux groupes a été observée 21 jours après l'injection des cellules tumorales (Figure 36a) ou après réinjection de cellules tumorales aux animaux survivants à J65 (Figure 36c) par rapport à J2. Par contre, une expansion de lymphocytes $T_{EM} CD8^+$ à J21 seulement dans le sang de souris ayant reçu l'IL-2 *mutein*, 21 jours après la première injection ainsi qu'après la réinjection de cellules tumorales à J65 a été observée (Figure 36b et d). Des expériences de culture de splénocytes *in vitro* nous ont permis d'observer une importante prolifération des lymphocytes T $CD8^+ CD44^+$ et des cellules NK en présence d'IL-2 wt et de l'IL-2 *mutein* de façon dose dépendante et similaire entre les deux protéines (non montré). Ces résultats suggèrent que l'IL-2 *mutein* est capable

d'améliorer l'effet vaccinal de souris traitées par l'anticorps anti-CD20 en permettant une forte activation des lymphocytes T CD8⁺ mémoires.

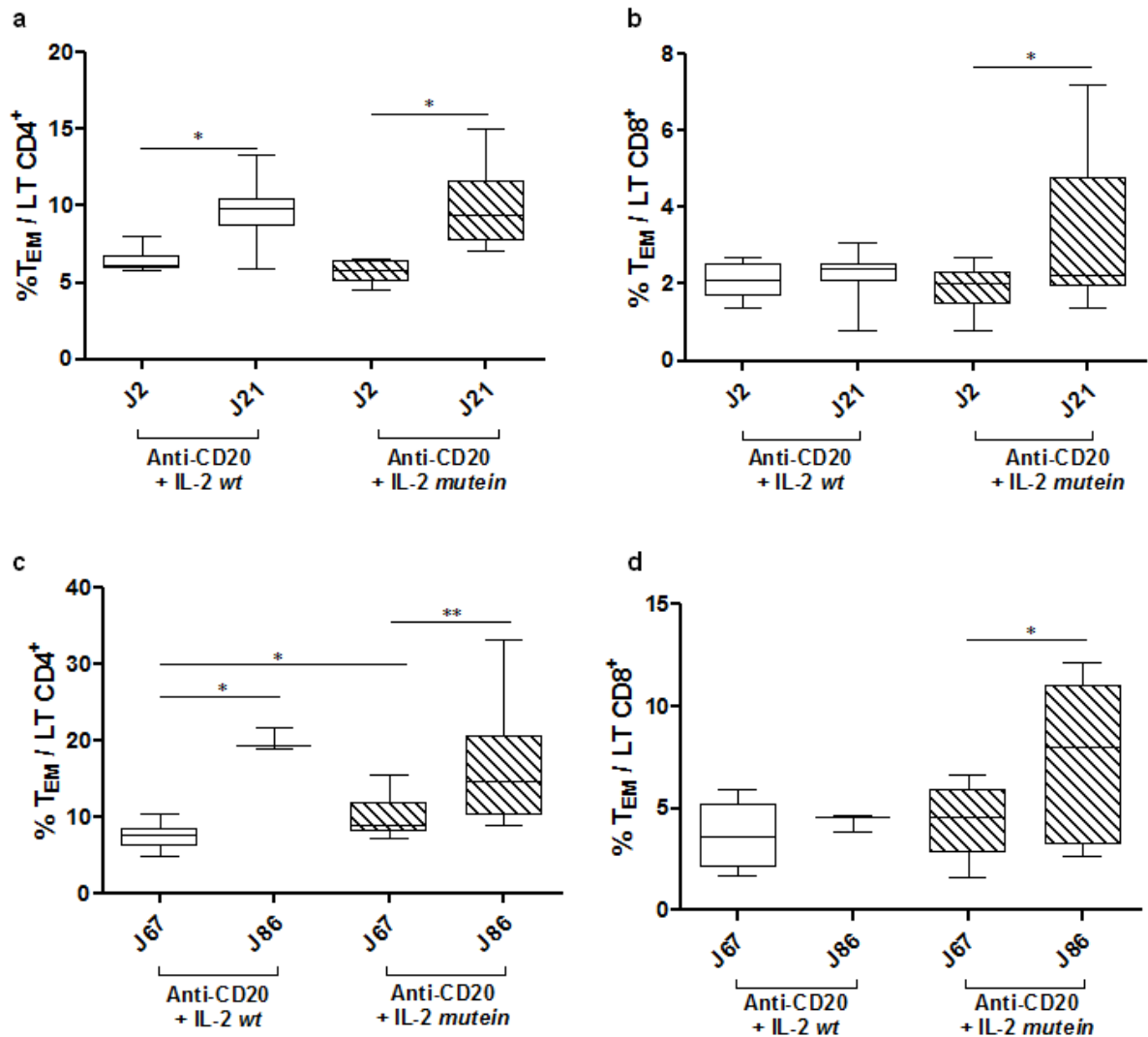


Figure 36. Le traitement combinatoire anticorps anti-CD20 et IL-2 mutein favorise une expansion des lymphocytes T effecteurs mémoires CD8⁺. (a et b) Des souris ont été injectées avec des cellules EL4-huCD20 par voie i.v. et ont été traitées avec l'anticorps anti-CD20 et l'IL-2 wt (boîtes blanches) (n=10) ou l'IL-2 mutein (boîtes rayées) (n=10). Les souris survivantes ont été réinjectée à J65 avec 4 x 10⁵ EL4-huCD20. Le sang des animaux a été prélevé à J2 et J21 (a et b) et à J67 et J86 (c et d). La présence des lymphocytes T_{EM} CD4⁺ et CD8⁺ a été évaluée par cytométrie en flux. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001.

Discussion

1- Le traitement par anticorps anti-CD20 induit l'apparition d'un pool de lymphocytes T CD4⁺ mémoires protecteurs à long terme.

Dans un premier temps, mon travail de thèse a consisté à analyser l'implication des lymphocytes T CD4⁺ dans la réponse anti-tumorale consécutive à un traitement par un anticorps anti-CD20 (CAT-13). Nous avons fait en effet l'hypothèse que le traitement par un anticorps anti-CD20 conduisait à l'apparition de lymphocytes T CD4⁺ mémoires et spécifiques de la tumeur, protégeant à long terme les animaux survivants. L'approche que nous avons utilisé, reposant sur la purification de lymphocytes T et leur transfert adoptif, nous a permis de démontrer que i) malgré le fait que le modèle utilisé (Abès et al., 2010) utilise une molécule CD20 humaine exprimée par des cellules EL4 injectées dans des souris immunocompétentes C57Bl/6, les lymphocytes T CD4⁺ provenant d'animaux non traités avec l'anticorps anti-CD20 ne permettent pas l'apparition d'une protection anti-tumorale ; ii) seul le traitement par l'anticorps anti-CD20 induit l'apparition de lymphocytes T CD4⁺ capables de protéger les animaux (Figure 20). Notre approche a utilisé un système de tri négatif par billes magnétiques couplées à un mélange d'anticorps incluant notamment un anticorps anti-CD11c permettant d'exclure les populations cellulaires CD4⁺ autres que les lymphocytes T (monocytes, DCs) et présentant l'avantage de sélectionner négativement les lymphocytes T CD4⁺ et donc de ne pas activer artificiellement ces cellules avec les anticorps. L'analyse phénotypique de souris survivantes à long terme a démontré un accroissement des lymphocytes T_{EM} parmi les lymphocytes T CD4⁺ (Figure 21) suggérant l'existence d'un pool de cellules mémoires spécifiques des cellules tumorales, induites par l'anticorps anti-CD20. Ces cellules sont par ailleurs capables de se réactiver *in vitro*, comme le montre leur production d'IFN- γ lorsqu'elles sont mises en présence de cellules tumorales EL4-huCD20 alors que les cellules EL4-*wt* n'ont aucun effet dans le même type de test (Figure 22). Ce résultat suggère que ces lymphocytes mémoires sont spécifiques de la molécule CD20 humaine et leur réactivation rapide (24h) est en accord avec ce que l'on peut attendre d'une réponse immunitaire mémoire. De plus, la production d'IFN- γ suggère que ces cellules sont issues de la différenciation de Th1 qui aboutit à des cellules fortement productrices d'IFN- γ (Pepper et Jenkins, 2011). Enfin, le transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺ mémoires de souris survivantes à long terme initialement traitées avec l'anticorps anti-CD20, qui aboutit à

la survie des souris receveuses injectées avec les cellules tumorales (Figure 23), conforte les résultats précédemment obtenus suggérant la mise en place d'un processus vaccinal anti-tumoral faisant suite au traitement par l'anticorps anti-CD20. Nous n'avons cependant pas identifié la spécificité antigénique de ces cellules mémoires T CD4⁺. Cela demande des approches complexes et coûteuses (notamment la définition et la validation de peptides candidats, fabrication de tétramères) que le laboratoire a initié non pas dans des modèles murins mais chez des patients présentant des lymphomes folliculaires et traités avec le rituximab (Dr Sophie Sibénil).

Afin de comprendre les mécanismes d'apparition de ces lymphocytes mémoires, nous avons analysé les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺, Th1, Th2, Th17 et Tregs spléniques à différents temps après injection des cellules tumorales. Nous avons démontré que les souris porteuses de tumeur présentent une importante expansion de Tregs, détectable à J21 et jusqu'à la mort des animaux qui survient la plupart du temps entre J25 et J30. Par contre, l'analyse des souris traitées avec l'anticorps anti-CD20 montre que cette expansion est stoppée, pour revenir au même niveau que celui observé chez des souris naïves alors que se met en place un important pool Th1 (Figure 18). Ainsi, les souris traitées avec l'anticorps anti-CD20 contrôlent l'expansion des Tregs spléniques induite par la présence des cellules tumorales, démontrant que le traitement par un anticorps anti-CD20 permet de bloquer l'immunosuppression induite par des cellules tumorales. Dans ce modèle expérimental, ni les Th2 ni les Th17 ne sont affectés. Il faut cependant souligner que cette expansion de Th1 producteurs d'IFN- γ , faisant suite au traitement par l'anticorps antiCD20 CAT-13, une IgG2a, est observée dans un contexte favorable, puisque les souris C57Bl/6 sont des animaux dont les réponses immunitaires ont une polarisation vers des réponses plutôt de type Th1 (caractérisées notamment au plan humoral par une production accrue d'IgG2a), à l'inverse des souris BALB/c qui développent préférentiellement des réponses de type Th2, caractérisées par une production d'IgG1. L'extension de nos observations à un modèle expérimental utilisant des souris BALB/c et comparant des anticorps anti-CD20 d'isotype IgG2a et IgG1 reste à établir.

Il est difficile de décrypter l'origine des Tregs. En effet, ces cellules peuvent se différencier *in situ* à partir de lymphocytes T CD4⁺ périphériques, grâce à un environnement de cytokines approprié (Tregs induits, iTregs), ou être recrutées directement par la tumeur, grâce à un gradient de chimiokines (Tregs naturels, nTregs). Il n'existe cependant pas de consensus quant au moyen de différencier les nTregs des iTregs, bien que des facteurs de transcriptions comme *Helios* aient été proposés pour distinguer ces deux populations de Tregs (Thornton et

al., 2010). Par ailleurs, une grande plasticité cellulaire, phénotypique et fonctionnelle, existe : c'est ainsi qu'il a été démontré qu'en présence d'IFN- γ , des Tregs peuvent présenter une expression accrue du facteur de transcription T-bet, pourtant spécifique des Th1 (Koch et al., 2009). Nous ne pouvons donc pas exclure qu'une partie des Tregs en expansion au cours des premières semaines après l'injection des cellules tumorales EL4-huCD20 n'est pas réorientée vers un phénotype Th1 du fait du traitement par l'anticorps anti-CD20. Dans le modèle expérimental étudié, le traitement avec un anticorps anti-CD25, qui provoque essentiellement une déplétion des Tregs, a permis d'induire une survie des animaux similaire à celle obtenue avec un traitement par l'anticorps anti-CD20 (Figure 17). Ce résultat souligne l'importance des Tregs dans la perte de contrôle de la croissance tumorale par le système immunitaire. L'absence d'effet additif voire synergique entre le traitement par l'anticorps anti-CD20 et celui par l'anticorps anti-CD25 peut s'expliquer par un taux de survie obtenu pour chacun de ces traitements déjà important, en moyenne 80%. Il reste à étudier une situation expérimentale où ces taux de survie seraient volontairement abaissés pour réexaminer cette question de l'additivité ou de la synergie des deux traitements. Il se pourrait que le traitement par l'anticorps anti-CD20 dans les conditions expérimentales utilisées permette un contrôle optimal du compartiment Tregs, ce qui pourrait conduire alors à une absence d'effet complémentaire lorsque le traitement par anticorps anti-CD25 est surajouté. A terme, l'utilisation d'une telle combinaison dans le champ clinique est toutefois improbable ; il existe une dichotomie entre ce qui est observé chez la souris et chez l'Homme : s'il est possible de protéger des animaux porteurs de tumeurs grâce à un traitement par un anticorps anti-CD25 (Moore et al., 2005 ; Fecci et al., 2006 ; Nishikawa and Sakaguchi, 2014), les essais cliniques ont été abandonnés chez les patients, par manque d'efficacité peut-être dû à la déplétion parallèle de cellules NK et de lymphocytes T activés exprimant CD25.

2- Les cellules NK et les DCs sont impliquées dans la mise en place et le maintien de la réponse immunitaire vaccinale induite par l'anticorps anti-CD20.

Nos résultats suggèrent que la présence de complexes formés par les cellules EL4-huCD20 et l'anticorps anti-CD20 (soit sous forme de cellules opsonisées ou de débris cellulaires) pourrait conduire à l'activation de DCs après capture de ces complexes par les RFc γ que ces cellules expriment à leur surface. Ces cellules aux fortes capacités de présentation antigénique seraient alors à l'origine de l'activation lymphocytaire T ; de fait, plusieurs études ont déjà décrit l'importance des RFc γ exprimés par les DCs dans la réponse immunitaire anti-tumorale. En

particulier, il a été démontré que la présence de complexes immuns favorise grandement les capacités de présentation croisée des DCs, par l'intermédiaire des RFc γ activateurs fixant ces complexes (Regnault et al., 1999 ; Liu et al., 2006 ; Kalergis et Ravetch, 2002 ; Nimmerjahn et Ravetch, 2008). L'analyse des DCs de ganglions lymphatiques à différents temps nous a permis de montrer une activation de ces cellules à J8 dans le groupe recevant l'anticorps anti-CD20, CAT-13, marquée par une expression des molécules de co-stimulation CD80 (qui peut également agir dans des circuits d'immunosuppression) et CD86, ainsi que par une très forte augmentation de l'expression membranaire des molécules de classe II du CMH, accompagné par une expression intracellulaire accrue d'IL-12 (Figures 27-29). Il est important de noter que notre système ne nous permet pas d'avoir accès au ganglion lymphatique drainant la tumeur, de par le caractère disséminé de celle-ci, les cellules tumorales étant initialement injectées par voie i.v. Faute d'avoir pu détecter une activation des DCs dans la rate, nous avons étudié les ganglions lymphatiques les plus à même d'être des sites de sensibilisation (« priming ») de lymphocytes T CD4⁺. L'expression accrue d'IL-12 observée est en adéquation avec l'expansion du compartiment Th1 observée (Figure 18), cette cytokine étant largement décrite comme étant indispensable à la polarisation Th1 (Manetti et al., 1993). Les expériences ultérieures que nous avons effectuées ont démontré que les concentrations sériques d'IL-12 étaient augmentées *in vivo* (Figure 24) par le traitement par l'anticorps anti-CD20 et que la neutralisation de cette cytokine *in vivo* limitait fortement et significativement l'expansion des Th1 observés à J21 dans le groupe traité par l'anticorps anti-CD20 (Figure 25). Il est également à noter que le pool de Th17 a été fortement augmenté dans cette situation de neutralisation de l'IL-12 *in vivo*. En revanche, cette neutralisation n'a pas modifié significativement le taux de survie des animaux qui est resté comparable à celui du groupe de souris traitées seulement avec l'anticorps anti-CD20. Ce résultat pourrait s'expliquer par le schéma d'injection utilisé, à savoir deux injections à J14 et J17, quelques jours avant que la polarisation Th1 ne devienne détectable. Cependant, une autre expérience (non montrée) où l'anticorps neutralisant l'IL-12 a été injecté à J5 a conduit au même résultat, l'absence d'impact significatif sur le taux de survie des animaux. Il faut souligner que les approches de biothérapie fondées sur l'utilisation d'IL-12 en complément d'un anticorps à usage thérapeutique se sont soldées par des échecs. L'une des hypothèses avancées a été que l'IL-12 induisait une anergie des lymphocytes T infiltrant la tumeur (« TILs »), du fait d'une expression accrue de la molécule immunosuppressive TIM-3.

Dans ces expériences de neutralisation de l'IL-12 *in vivo*, la baisse de la polarisation Th1 normalement induite par l'anticorps anti-CD20 a été contrebalancée par une augmentation du nombre de Th17. Ce résultat, similaire à celui observé après déplétion des cellules NK dans le groupe traité, pourrait être lié à l'antagonisme qui existe entre le développement des Th1 et celui des Th17. Ces dernières cellules ont en effet en commun avec les Tregs le fait qu'elles nécessitent du TGF- β pour leur différenciation, cytokine que nous avons retrouvée en plus grandes quantités dans le sang des animaux porteurs de tumeurs. La baisse de l'axe de polarisation Th1 pourrait ainsi provoquer une expansion de Th17, entretenant ou induisant une inflammation liée à la tumeur. Ces Th17, et de façon plus général, le rôle de l'inflammation dans la tumorigenèse reste très controversé. Diverses publications ont rapporté un rôle positif ou négatif des Th17 et de l'inflammation en fonction des types de cancers. La sécrétion d'IL-6 et l'activation de STAT3, le TGF- β et l'IL-10 sont par exemple couramment associés à la tumorigenèse (Elinav et al., 2013). L'interaction entre Th17 et Tregs conduit à des modifications fonctionnelles des Th17 qui seraient associées à la croissance tumorale et à l'immunosuppression (Bailey et al., 2014).

L'implication des cellules NK dans la réponse immunitaire initiale suite à l'infusion d'anticorps à usage thérapeutique est une question faisant l'objet de débats, notamment dans les modèles murins où les cellules myéloïdes comme les macrophages, qui expriment le RFc γ IV (orthologue murin du RFc γ IIIa humain) et le RFc γ III (orthologue murin du RFc γ IIa humain), sont considérées comme jouant un rôle majeur dans l'ADCC, les cellules NK ne jouant qu'un rôle marginal (Tedder et al., 2006 ; Setiady et al., 2010 ; Simpson et al., 2013). Cependant, le RFc γ IIIa est exprimé chez l'Homme très fortement sur les cellules NK et il a été montré que le polymorphisme de ce récepteur impacte la réponse clinique des patients traités par le rituximab (Cartron et al., 2002 ; Weng and Levy, 2003). Ces deux dernières observations ont suggéré un rôle important des cellules NK chez les patients présentant un LF et traités par le rituximab. Il est cependant important de noter que l'anticorps CAT-13 utilisé dans notre modèle expérimental est une IgG2a qui lie le RFc γ I avec une forte affinité et le RFc γ IV avec une affinité intermédiaire. Cette caractéristique est à mettre en regard avec l'implication des DCs dans la mise en place d'une immunité anti-tumorale, telle que nous l'avons observée (Figures 26-29) et rend probable l'implication d'autres cellules phagocytaires (macrophages, cellules de Kupffer) dans notre modèle expérimental comme cela a été montré dans un autre modèle murin de traitement par anticorps anti-CD20 (Montalvao et al., 2013).

Nos analyses ne nous ont cependant pas permis de détecter une activation des macrophages spléniques (non montré). Par contre, nous avons mis en évidence le rôle majeur joué par les cellules NK dans la protection anti-tumorale induite par le traitement par l'anticorps anti-CD20 dans notre modèle expérimental. Le pourcentage de cellules NK spléniques des souris traitées avec l'anticorps anti-CD20 est augmenté par rapport à celui des animaux non traités ou naïfs (Figure 32). Leur déplétion aboutit à une importante diminution du taux de survie des souris traitées par l'anticorps anti-CD20 (Figure 33), ainsi qu'à une baisse du nombre de Th1 (Figure 34). Nos résultats expérimentaux suggèrent donc que les cellules NK sont des éléments centraux dans la mise en place d'une protection anti-tumorale rapide une fois l'anticorps fixé à sa cible cellulaire, vraisemblablement grâce à un mécanisme d'ADCC et/ou la production de cytokines comme le $\text{TNF}\alpha$ et l' $\text{IFN-}\gamma$. Leur capacité à produire de l' $\text{IFN-}\gamma$ (Figure 32) contribue très probablement au recrutement et à la persistance de cellules immunitaires mémoires de la tumeur. L'état d'activation prolongé des cellules NK dans notre modèle (qui reste détectable à J21) pourrait être lié à la persistance de l'anticorps anti-CD20 CAT-13 dans la circulation (Abès et al., 2010). Cette importance probable des cellules NK dans la réponse clinique faisant suite au traitement par un AcM anti-CD20.

L'impact de nos manipulations tant des cellules NK et des DCs que des cytokines que produisent ces cellules ($\text{IFN-}\gamma$ et IL-12) nous amène à faire l'hypothèse d'un dialogue étroit entre ces deux populations cellulaires, chaque population étant impliquée dans l'activation de l'autre ; ce dialogue apparaît nécessaire pour que s'installe une réponse anti-tumorale adaptative s'inscrivant dans le long terme. Il a été d'ailleurs démontré que l'IL-12 produit par les DCs favorise la production d' $\text{IFN-}\gamma$ et l'activité cytotoxique des NK, par le biais d'un mécanisme dépendant d'un contact cellulaire impliquant la formation d'une synapse immunologique (Fernandez et al., 1999 ; Borg et al., 2004). De la même manière, il a été montré qu'il était possible d'induire une réponse T CD8^+ contre un lymphome, indépendamment des cellules CD4^+ , grâce à un dialogue NK-DC (Adam et al., 2005). Ce dialogue semble jouer un rôle important dans le développement et la qualité des réponses immunitaires anti-tumorales faisant suite aux traitements de tumeurs par des AcM (Lee et al., 2011). Nous pensons donc qu'il existe un dialogue NK-DC dans le modèle expérimental que nous avons utilisé, indispensable au développement d'une réponse immunitaire vaccinale, grâce à l'activation réciproque de ces deux populations cellulaires, activation qui conduit d'une part à une réponse Th1 efficace et d'autre part à la différenciation de ces cellules en cellules T effectrices mémoires.

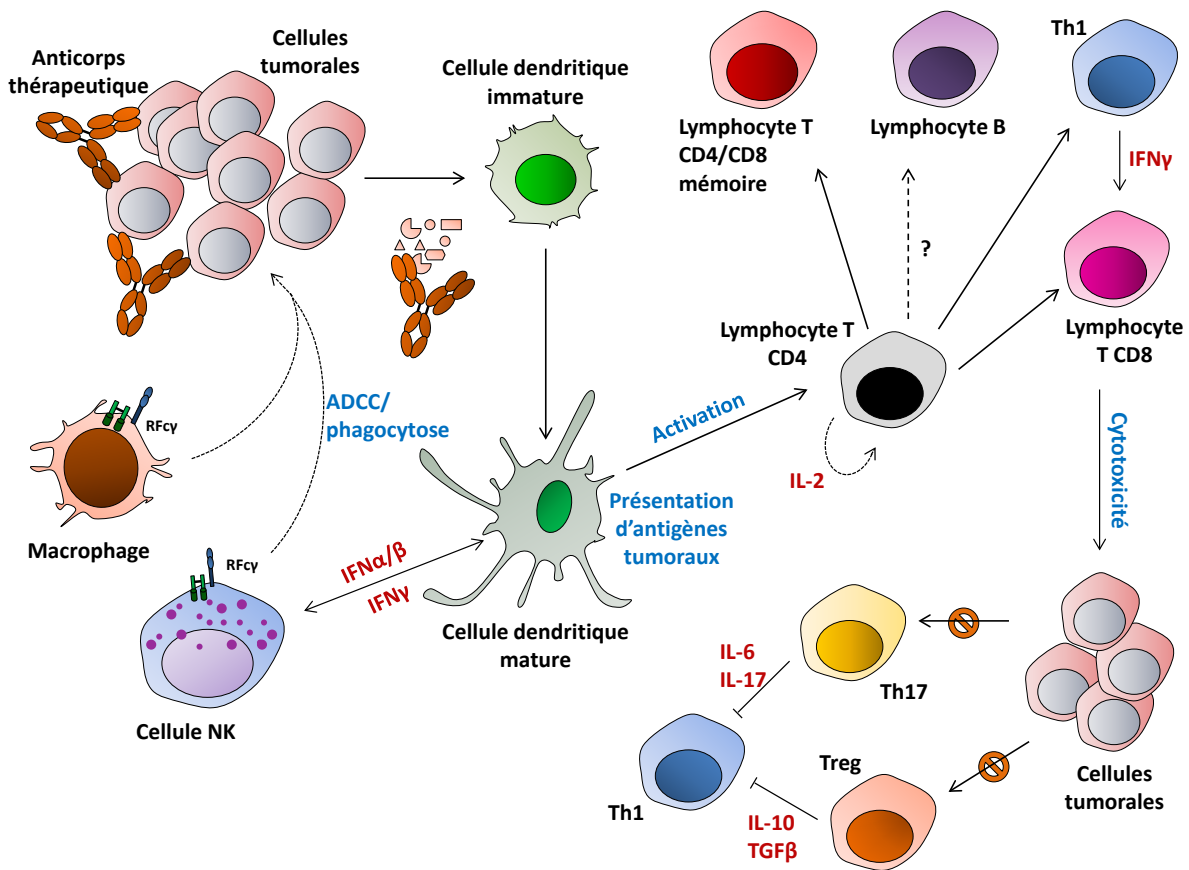


Figure 37. Induction d'une immunité anti-tumorale adaptative par les anticorps monoclonaux. Les cellules tumorales recouvertes d'anticorps sont détruites par divers mécanismes effecteurs. Les fragments cellulaires, corps apoptotiques et complexes antigène/anticorps sont alors capturés par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), qui vont activer des lymphocytes T CD4⁺. Ces derniers induisent l'activation de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, sans doute de lymphocytes B, ainsi que l'apparition de lymphocytes T et B mémoires (CD4⁺ et CD8⁺). Cette immunité adaptative va alors contrecarrer les mécanismes inhibiteurs induits par les cellules tumorales et l'inflammation accompagnant la croissance tumorale, en contrebalançant l'action des lymphocytes T régulateurs (Treg) et des cytokines immunosuppressives et/ou pro-inflammatoire (IL-10, IL-6...). La présentation croisée d'antigènes tumoraux par les CPA à des lymphocytes T CD8⁺ ainsi que les cellules myéloïdes suppressives comme les macrophages de type « M2 » ne sont pas représentées.

3- Un traitement combinatoire associant l'anticorps anti-CD20 avec un variant d'IL-2 potentialise la réponse immunitaire anti-tumorale.

Au cours de nos travaux, nous avons démontré l'existence d'une immunité anti-tumorale essentiellement portée par des lymphocytes T CD4⁺ mémoires spécifiques de la molécule CD20 humaine, les souris survivantes n'étant pas protégées dans le cas d'une réinjection de cellules tumorales EL4-*wt*. Nous avons donc recherché une stratégie pour potentialiser la

réponse immunitaire anti-tumorale induite par l'anticorps anti-CD20 en stimulant les lymphocytes T anti-tumoraux. Notre choix s'est porté sur l'utilisation d'une interleukine, l'IL-2, dont l'utilisation à des fins thérapeutiques, fondée sur ses capacités d'expansion des populations T anti-tumorales, a conduit à des AMM ayant comme indication le mélanome métastatique et les carcinomes rénaux (Mulé et al., 1984 ; Rosenberg et al., 1986 ; Spiess et al., 1987 ; Rosenberg et al., 1987).

Cependant, des travaux antérieurs du laboratoire avaient montré que le taux de survie de souris ayant reçu des cellules tumorales EL4-huCD20, traitées par l'anticorps anti-CD20 et recevant de l'IL-2 de façon concomitante n'était pas différent de celui de souris traitées uniquement par l'anticorps anti-CD20 (Abès et al., 2010). Nous avons donc fait l'hypothèse que cette absence d'effet de l'IL-2 pourrait être due au fait que cette cytokine permet de recruter le compartiment Tregs, en ne renforçant que modérément le compartiment Th1 induit par le traitement par l'anticorps anti-CD20. La fin de mon travail de thèse a donc consisté à évaluer l'efficacité thérapeutique d'un traitement combinatoire associant l'anticorps anti-CD20 CAT-13 avec une IL-2 mutée (*IL-2 mutein*), actuellement développée par les équipes du CIM de La Havane (Cuba). Cette dernière se fixe plus faiblement au récepteur de haute affinité du récepteur de l'IL-2 ($\alpha\beta\gamma$) fortement exprimé par les Tregs (Takahashi et al., 1998) et pourrait donc, contrairement à l'IL-2 *wt*, renforcer le compartiment Th1 induit par le traitement par l'anticorps anti-CD20 sans activer significativement le compartiment Tregs. Les travaux que j'ai effectués ont démontré que les animaux ayant reçu l'anticorps anti-CD20 et l'IL-2 *mutein* ont un taux de survie très élevé (95%), qui représente le meilleur pourcentage de survie que nous n'ayons jamais observé en utilisant ce modèle expérimental. De plus, lorsque les animaux survivants (traités par l'anticorps anti-CD20, traités par l'anticorps anti-CD20 et l'IL-2 *wt*, traités par l'anticorps anti-CD20 et l'IL-2 *mutein*) ont subi une réinjection de cellules EL4-huCD20, les souris ayant reçu l'IL-2 *mutein* en combinaison avec l'anticorps anti-CD20 ont survécu plus longtemps que les animaux des deux autres groupes (Figure 35). Notre hypothèse est que l'IL-2 *wt* stimule aussi bien les lymphocytes T activés que les Tregs, ce qui limite ainsi son efficacité thérapeutique, l'IL-2 *mutein* ne stimulant préférentiellement que les lymphocytes exprimant le récepteur d'affinité intermédiaire $\beta\gamma$ pour l'IL-2, essentiellement exprimé par les lymphocytes activés. Cela pourrait expliquer l'amélioration de la survie lors de la phase initiale du traitement, avant toute réinjection de cellules tumorales. Le décalage observé dans la cinétique de survie après réinjection des cellules tumorales aux animaux ayant reçu le traitement combinatoire anticorps anti-CD20 + IL-2

mutein par rapport aux animaux survivants des deux autres groupes (ayant reçu soit uniquement l'anticorps anti-CD20 soit la combinaison anticorps anti-CD20 + IL-2 *wt*) indique un contrôle anti-tumoral partiel chez ces souris, suggérant l'influence de lymphocytes mémoires. L'analyse des lymphocytes T périphériques de ces animaux a démontré effectivement une expansion de lymphocytes T_{EM} CD4⁺ et CD8⁺ 21 jours après l'injection des cellules tumorales, ainsi qu'après leur réinjection (Figure 36). La présence accrue de lymphocytes T_{EM} CD4⁺ étant retrouvée dans les deux groupes d'animaux (ayant reçu soit l'anticorps anti-CD20 + IL-2 *mutein* soit l'anticorps anti-CD20 + IL-2 *wt*) (Figure 36a et c), celle-ci apparaît être essentiellement liée au traitement par l'anticorps anti-CD20. Nous avons d'ailleurs mis en évidence une population T_{EM} CD4⁺ à J65 chez des animaux survivants traités par l'anticorps anti-CD20 (Figure 21). En revanche, les souris ayant reçu le traitement combinant l'anticorps anti-CD20 et l'IL-2 *mutein* présentent un pool de lymphocytes T_{EM} CD8⁺ qui n'est pas détecté chez les animaux des deux autres groupes (Figure 36b et d). Cette observation indique que l'IL-2 *mutein* améliore l'effet vaccinal de souris traitées par l'anticorps anti-CD20 en permettant une forte activation des lymphocytes T CD8⁺ mémoires. La spécificité de cette réponse fait actuellement l'objet d'un travail qui se poursuit au laboratoire.

4- Discussion générale – Limites et mise en perspective.

Les résultats observés dans notre modèle expérimental sont à remettre dans un contexte d'expérimentation animale et de limitation de notre accès à différents outils cellulaires et moléculaires. Les souris C57Bl/6 que nous utilisons sont marquées par une absence de brassage génétique qui représente évidemment un biais majeur par rapport à la situation rencontrée chez des patients, chez lesquels les réponses cliniques sont très hétérogènes. De même, les animaux que nous utilisons sont de jeunes souris (sept semaines en moyenne), contrairement à la très grande majorité des patients atteints de lymphomes (âge médian au diagnostic : 66 ans). Récemment, une étude a mis en lumière les très fortes réactions inflammatoires présentes chez des souris âgées, réactions qui ne sont pas détectées chez les jeunes souris suite à un traitement immuno-thérapeutique contre une tumeur (Bouchlaka et al., 2013). Enfin, il semble que les souris de laboratoire soient maintenues à des températures trop basses (22-24°C en moyenne). Un article récent a montré qu'une température plus élevée

(30°C) permettait d'améliorer la qualité des réponses anti-tumorales et la composition de l'infiltrat immunitaire intra-tumoral d'animaux atteints de tumeurs (Kokolus et al., 2013).

A l'inverse, notre modèle présente l'avantage d'une injection par voie i.v. de cellules tumorales, mais aussi celui d'utiliser des animaux immunocompétents, à l'inverse des greffes xénogéniques sur souris NOD/SCID par exemple. Ce modèle pose bien évidemment la question de l'immunogénicité de la molécule de CD20 humaine, question que nous avons extensivement étudiée. Les études antérieures avaient déjà démontré que, *per se*, les cellules EL4-huCD20 ne sont pas capables d'induire une réponse immunitaire spécifique détectable (Abès et al., 2010). Plusieurs résultats obtenus au cours de mon travail de thèse montrent également l'absence de réponse détectable et protectrice directement due à cette molécule xénogénique CD20 humaine, comme ceux de nos expériences de transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺ de souris porteuses de tumeurs, non traitées, qui n'induit aucune protection des animaux receveurs contre les cellules tumorales.

Utilisant ce modèle expérimental où les cellules tumorales sont injectées par voie i.v., nous n'avons pu comparer la réponse immunitaire adaptative spécifique observée dans les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques) avec celle présente dans des infiltrats immunitaires dans les masses tumorales des animaux traités par l'anticorps anti-CD20, en raison du fait que ces animaux survivants ne présentent pas de tumeur solide observable à l'autopsie. L'étude comparative des lymphocytes T spléniques de souris traitées avec l'anticorps anti-CD20 CAT-13 et répondant ou non à ce traitement nous a cependant permis de mettre en évidence que les souris « non répondeuses » présentaient un profil phénotypique similaire à celui observé chez les souris traitées avec un anticorps contrôle de même isotype, c'est-à-dire une forte polarisation T vers les Tregs. Il serait intéressant de comparer chez des animaux « répondeurs » et « non-répondeurs » au traitement par l'anticorps anti-CD20 l'expression des molécules immuno-modulatrices, telles que TIM-3, LAG3, PD-1 et CTLA-4. Cependant, il est à noter que l'expression de PD-1 dans les LF a été corrélée à un pronostic favorable, soulignant la complexité du microenvironnement immunitaire et la difficulté à tirer des conclusions définitives sur la présence de tel ou tel marqueur ou de tel ou tel compartiment cellulaire (Carreras et al., 2009b). Il a été de plus observé que l'efficacité d'un anticorps à usage thérapeutique peut varier en fonction de la localisation histologique de la tumeur (Westwood et al., 2010).

Nous avons de plus observé que les cellules isolées à partir des masses tumorales des souris « non-répondeuses » au traitement présentent une diminution marquée de l'expression membranaire de la molécule CD20 humaine au moment de la mort des animaux (non montré). A l'inverse, les cellules tumorales isolées à partir de souris non traitées ont une expression plus forte de CD20 (avec un spectre d'expression plus hétérogène) au moment du sacrifice de ces animaux. Ce résultat indique une sélection de cellules CD20⁻ chez les souris traitées par un anticorps anti-CD20. Différents articles ont documenté des phénomènes d'internalisation de CD20 après la fixation d'un anticorps, et des conséquences que cela peut avoir sur la réponse clinique du patient concerné (Beum et al., 2011). Les cellules de LLC-B auraient par exemple une capacité d'internalisation du CD20 bien supérieure à celles de LF (Beers et al., 2010), ce qui contribuerait à leur faible sensibilité au rituximab. Parmi les mécanismes proposés, il y aurait une diminution de l'expression de CD20 à la membrane et un « rasage » de CD20 à la surface des cellules (Taylor et Lindorfer, 2010 ; Beum et al., 2011).

Enfin, il existe un impact notable de l'épitope de CD20 reconnu par l'anticorps utilisé sur la cinétique de déplétion des cellules CD20⁺ ainsi que sur l'activation du système immunitaire. Des différences ont en effet été observées entre les anticorps de type I, comme le rituximab et l'ofatumumab, et de type II comme l'obinutuzumab ; malgré le fait que les épitopes reconnus par les deux types d'anticorps soient chevauchants, les anticorps de type II fixent CD20 avec une conformation différente de celle des anticorps de type I, ce qui aurait des conséquences le contrôle de l'internalisation du CD20 (Beers et al., 2010). De même, le fait que l'ofatumumab reconnaisse un épitope déterminé à la fois par la grande boucle et une partie de la petite boucle extracellulaire de CD20, contrairement au rituximab qui reconnaît un épitope situé sur la grande boucle, a des conséquences fonctionnelles : la reconnaissance de la petite boucle rapproche l'anticorps de la membrane cellulaire, contrairement au rituximab, ce qui facilite le dépôt de complément sur la surface cellulaire et contribue à l'augmentation de l'efficacité de CDC de l'ofatumumab par rapport à celle du rituximab. Ainsi, nous ne pouvons exclure que l'épitope du CD20 reconnu par l'anticorps CAT-13 que nous avons utilisé, un anticorps de type I comme le rituximab, pourrait avoir une influence sur les réponses immunitaires observées, même s'il a été montré que l'engagement de sa portion Fc est indispensable et probablement à l'origine de l'induction de la réponse après avoir fixé les RFcγ des cellules NK et des cellules myéloïdes comme les DCs (Abès et al., 2010). L'anticorps CAT-13 a été utilisé pour générer un anticorps chimérique anti-CD20, le LFB-R603 ou ublituximab, qui possède donc les mêmes domaines variables que l'anticorps parental et dont la glycosylation

est caractérisée par un faible taux de fucose afin d'améliorer ses capacités d'ADCC. Cet AcM à usage thérapeutique est actuellement en cours d'évaluation clinique pour le traitement de LLC-B et de lymphomes non-Hodgkiniens et a démontré in vitro une ADCC 100 fois plus efficace vis-à-vis de cellules de LLC-B que le rituximab (de Romeuf et al., 2008). Ainsi, notre étude s'inscrit dans la compréhension des mécanismes cellulaires impliqués chez les patients traités par l'ublituximab et l'évaluation de thérapies combinatoires potentielles.

Un autre point très important qui n'a pu être abordé dans le modèle que nous avons utilisé concerne la déplétion, à plus ou moins long terme, des lymphocytes B endogènes avec les anticorps anti-CD20 et la rupture de tolérance que nos résultats impliquent dans ce cadre-là. Le fait de cibler la molécule CD20 humaine exprimée sélectivement par les cellules EL4-huCD20 n'a pas d'impact sur les lymphocytes B endogènes de la souris, l'anticorps utilisé n'ayant pas de réaction croisée avec la molécule CD20 de souris. Au-delà de l'impact d'une lymphopénie B à long terme sur la santé des patients (il a été observé une plus grande sensibilité aux infections chez certains patients), l'importance de cette lymphopénie chez certains patients, qui s'inscrit dans la durée, pourrait signer la présence d'un effet vaccinal caractérisé par une immunisation contre des antigènes des lymphocytes B tumoraux et normaux. Dans notre modèle expérimental, nous n'avons pas observé de réponse immunitaire humorale, ce qui suggère que la réponse immunitaire déclenchée par le traitement par l'anticorps anti-CD20 est une immunité cellulaire adaptative impliquant les lymphocytes T.

Enfin, nous avons émis l'hypothèse que la présence de cette immunité vaccinale protectrice à long terme contre les cellules tumorales est à l'origine d'un état d'équilibre entre le système immunitaire de l'hôte et des cellules tumorales résiduelles dormantes, selon la théorie de « l'immunoediting » proposée par Robert Schreiber (Schreiber et al., 2011). Malgré quelques expériences consistant à provoquer une immunodéficience expérimentale à des souris survivantes (déplétion des cellules CD4⁺, déplétion des cellules CD8⁺ et neutralisation de l'IFN- γ), nous n'avons pas pu mettre en évidence jusqu'à présent une récurrence tumorale conduisant au décès des animaux. L'existence et le maintien d'un tel état d'équilibre, décrit chez de nombreux patients cancéreux, pourrait être renforcé par l'effet vaccinal des AcM à usage thérapeutique qui pourrait affecter directement le temps de rechute de patients atteints de lymphome non-Hodgkiniens par exemple.

Le rituximab a également obtenu une AMM pour le traitement de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (RA), de granulomatose de Wegener (GPA) et de polyangéite

microscopique (MPA) ; la question d'une immunité à long terme induite par le traitement par le rituximab se pose également dans ces pathologies. Il a été noté, chez certains de ces malades, une hypogammaglobulinémie prolongée après l'arrêt du traitement par le rituximab, ce qui pourrait suggérer un effet à long terme. Les preuves de l'existence de réponses immunitaires à long terme induites par le rituximab dans ces pathologies auto-immunes n'ont cependant pas été apportées. On peut penser que l'importance des désordres immunitaires dont sont affectés ces patients rend difficile l'interprétation de ce type de réponse, mais aussi que le contexte particulier des lymphomes favorise le développement de telles réponses immunitaires, ce processus de vaccination étant probablement le résultat d'une succession d'évènements moléculaires et cellulaires se produisant dans un contexte bien particulier.

Pour conclure, ce nouveau paradigme a d'importantes conséquences concernant l'articulation des traitements par AcM avec les autres traitements comme la radiothérapie et la chimiothérapie. Les cellules du système immunitaire en général et les lymphocytes en particulier sont sensibles à la lyse induite par ces traitements ; il est cependant désormais largement documenté que les drogues dites immunogéniques peuvent potentialiser la réponse immunitaire grâce au processus de MCI (Vacchelli et al., 2014). Dans leur étude décrivant l'induction d'une réponse immunitaire adaptative suite au traitement de souris porteuses de tumeurs mammaires avec un AcM anti-HER2/Neu, Park *et al.* ont démontré que cet effet vaccinal pouvait être potentialisé par l'administration d'une chimiothérapie trois jours après le traitement par anticorps, alors que, au contraire, cet effet est complètement abrogé lorsque l'AcM et la chimiothérapie sont administrés conjointement. Ces expériences soulignent l'importance d'identifier une fenêtre thérapeutique permettant une réponse optimale à ce type de combinaisons thérapeutiques pour le traitement de cancers. Une autre conséquence de ce paradigme est la nécessité de prendre en considération la toxicité des traitements immuno-thérapeutiques administrés aux patients cancéreux. L'utilisation de cytokines ou d'anticorps ciblant des molécules immuno-modulatrices est en partie limitée en raison de leur importante toxicité aux doses utilisées. Ainsi, l'utilisation de thérapies combinant un anticorps anti-CD20 avec un AcM immuno-modulateur à plus faible dose peut représenter une alternative clinique, actuellement testée avec des anticorps anti-PD1 (Westin et al., 2014).

La vision ainsi renouvelée de l'action des AcM utilisés en oncologie comme étant capables d'avoir un effet vaccinal représente une avancée importante et ouvre des perspectives de thérapies combinatoires efficaces. Il est très probable que cette vision d'un effet vaccinal des anticorps à usage thérapeutique ne soit pas l'apanage du seul milieu de l'oncologie. A titre

d'exemple, une étude récemment parue a démontré que l'administration d'AcM chez des singes infectés par le Virus de l'Immunodéficience Simien (VIS) provoquait un accroissement des réponses lymphocytaires T contre la protéine d'enveloppe Gag (Barouch et al., 2013). On peut donc supposer que de telles réponses immunitaires adaptatives induites par le traitement par anticorps peuvent se développer non seulement dans les situations de pathologies cancéreuses et auto-immunes, mais aussi dans des cas de maladies infectieuses d'origine virale traitées par anticorps, comme c'est le cas pour le virus d'Ebola, de la grippe, du coronavirus, ou du virus de l'immunodéficience humaine (Zhu et al., 2013).

Conclusion et perspectives

L'hypothèse d'un effet vaccinal des anticorps à usage thérapeutique en oncologie a émergé depuis quelques années et est appuyée par un nombre de plus en plus important d'études cliniques et précliniques (Abès et al., 2010 ; Park et al., 2010 ; Yang et al., 2013). Cet effet impliquant les lymphocytes T a été rapporté pour des anticorps anti-tumoraux tels que des anticorps anti-CD20, anti-EGFR et anti-HER2/Neu et vient compléter l'action déjà bien décrite des mécanismes liés à l'expression des RFcγ (ADCC) ou à l'activation de la voie classique du complément (CDC). Chez les patients cancéreux, cet effet vaccinal dont nous ne maîtrisons pas tous les paramètres à ce jour pourrait rendre compte de la variabilité des taux et cinétiques de rechute, mais aussi permettre d'articuler ces thérapies avec des traitements classiques comme ceux de chimiothérapie, de radiothérapie et avec des traitements immuno-modulateurs.

Lors de mon travail de thèse, nous avons démontré que la protection anti-tumorale à long terme induite par l'anticorps anti-CD20 orientait une polarisation initiale vers les Treg, pro-tumorale, vers une polarisation Th1 anti-tumorale et que la survie des animaux traités était dépendante de lymphocytes T CD4⁺ effecteurs mémoires spécifiques de la molécule CD20 humaine, protecteurs à long terme. L'apparition de ces lymphocytes anti-tumoraux est liée à une activation des cellules NK et des DCs, ainsi qu'à la production d'IFN-γ et d'IL-12.

Nous avons aussi démontré que la survie des animaux traités par l'anticorps anti-CD20 pouvait être améliorée grâce à une combinaison thérapeutique associant l'anticorps avec l'utilisation d'un variant d'IL-2 humaine à l'affinité moindre pour le récepteur de l'IL-2 αβγ, cette thérapie combinatoire permettant de mettre en évidence une expansion de lymphocytes T CD8⁺ mémoires accompagnant l'effet vaccinal de l'anticorps.

Dans les mois à venir, nous allons poursuivre le décryptage des effets de cette thérapie combinatoire en analysant divers aspects du modèle expérimental utilisé : nous allons suivre l'évolution des Tregs et des Th1 afin de comprendre le rôle différentiel de l'IL-2 *wt* et de l'IL-2 *mutein* sur les capacités fonctionnelles de ces populations cellulaires. Des expériences de réinjection de cellules EL4-*wt* à des souris survivantes seront effectuées afin d'étudier la reconnaissance croisée d'antigènes tumoraux et donc une possible rupture de tolérance. Afin d'étudier l'impact de ce type de thérapie sur des animaux déjà immunisés, des souris survivantes après traitement par l'anticorps anti-CD20 seront traitées par l'IL-2 *mutein* au

moment de la réinjection de cellules tumorales et non à la phase initiale. Nos résultats suggérant une implication des lymphocytes T CD8⁺ lors de la phase initiale, nous allons suivre leur état d'activation dans le temps et évaluer leur capacité protectrice anti-tumorale à l'aide d'expériences de transferts adoptifs. Les cellules NK, sensibles à l'IL-2 et hautement impliquées dans notre modèle, seront analysées afin de comprendre comment leur manipulation pourrait améliorer l'effet vaccinal d'un anti-CD20.

La principale limite de notre modèle est l'expression de la molécule CD20 humaine, une molécule xénogénique pour la souris. Afin de s'affranchir de ce biais, nous sommes en train de développer un modèle murin de lymphome syngénique et d'étudier l'effet vaccinal d'anticorps anti-CD20 dans un système où les lymphocytes B endogènes subissent une déplétion. Ce nouveau modèle nous permettra d'évaluer l'existence d'une immuno-surveillance T mémoire dans un système syngénique, ainsi que les mécanismes de rupture de la tolérance au soi. Cela nous permettra également de comprendre les événements cellulaires à l'origine d'un éventuel délai dans la repopulation des lymphocytes B endogènes, ainsi que les modifications de répartition des sous-populations lymphocytaires B qui pourraient lui être associées.

Enfin, le laboratoire a commencé à étudier l'effet vaccinal des anticorps anti-CD20 chez des patients atteints de LF. Le sang de patients traités par R-CHOP sera prélevé avant et pendant les traitements ainsi que lors de la thérapie d'entretien. Une seconde cohorte, rétrospective, nous permettra d'avoir accès à des prélèvements à distance de la fin de la thérapie d'entretien. Les compartiments lymphocytaires T issus de ces patients seront étudiés par différentes approches. L'ensemble de tous ces travaux permettra de consolider le concept d'un effet vaccinal des AcM en oncologie.

Bibliographie

Abès, R., Gélizé, E., Fridman, W.H., and Teillaud, J.-L. (2010). Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood* 116, 926–934.

Adam, C., King, S., Allgeier, T., Braumüller, H., Lüking, C., Mysliwietz, J., Kriegeskorte, A., Busch, D.H., Röcken, M., and Mocikat, R. (2005). DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 106, 338–344.

Advani, R., Forero-Torres, A., Furman, R.R., Rosenblatt, J.D., Younes, A., Ren, H., Harrop, K., Whiting, N., and Drachman, J.G. (2009). Phase I study of the humanized anti-CD40 monoclonal antibody dacetuzumab in refractory or recurrent non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 4371–4377.

Afshar-Sterle, S., Zotos, D., Bernard, N.J., Scherger, A.K., Rödling, L., Alsop, A.E., Walker, J., Masson, F., Belz, G.T., Corcoran, L.M., et al. (2014). Fas ligand-mediated immune surveillance by T cells is essential for the control of spontaneous B cell lymphomas. *Nat. Med.* 20, 283–290.

Agopian, J., Navarro, J.-M., Gac, A.-C., Lecluse, Y., Briand, M., Grenot, P., Gauduchon, P., Ruminy, P., Lebailly, P., Nadel, B., et al. (2009). Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *J. Exp. Med.* 206, 1473–1483.

Aliprantis, A.O., Diez-Roux, G., Mulder, L.C., Zychlinsky, A., and Lang, R.A. (1996). Do macrophages kill through apoptosis? *Immunol. Today* 17, 573–576.

Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503–511.

Amigorena, S., Salamero, J., Davoust, J., Fridman, W.H., and Bonnerot, C. (1992a). Tyrosine-containing motif that transduces cell activation signals also determines internalization and antigen presentation via type III receptors for IgG. *Nature* 358, 337–341.

Amigorena, S., Bonnerot, C., Drake, J.R., Choquet, D., Hunziker, W., Guillet, J.G., Webster, P., Sautes, C., Mellman, I., and Fridman, W.H. (1992b). Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* 256, 1808–1812.

Ansell, S.M., Witzig, T.E., Kurtin, P.J., Sloan, J.A., Jelinek, D.F., Howell, K.G., Markovic, S.N., Habermann, T.M., Klee, G.G., Atherton, P.J., et al. (2002). Phase 1 study of interleukin-12 in combination with rituximab in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 99, 67–74.

Ansell, S.M., Geyer, S.M., Maurer, M.J., Kurtin, P.J., Micallef, I.N.M., Stella, P., Etzell, P., Novak, A.J., Erlichman, C., and Witzig, T.E. (2006). Randomized Phase II Study of Interleukin-12 in Combination with Rituximab in Previously Treated Non-Hodgkin's Lymphoma Patients. *Clin. Cancer Res.* 12, 6056–6063.

Ansell, S.M., Lesokhin, A.M., Borrello, I., Halwani, A., Scott, E.C., Gutierrez, M., Schuster, S.J., Millenson, M.M., Cattry, D., Freeman, G.J., et al. (2014). PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.*

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Criollo, A., Ortiz, C., Lidereau, R., Mariette, C., Chaput, N., Mira, J.-P., Delaloge, S., et al. (2007). The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol. Rev.* 220, 47–59.

Avivi, I., Stroopinsky, D., and Katz, T. (2013). Anti-CD20 monoclonal antibodies: Beyond B-cells. *Blood Rev.* 27, 217–223.

Bailey, S.R., Nelson, M.H., Himes, R.A., Li, Z., Mehrotra, S., and Paulos, C.M. (2014). Th17 Cells in Cancer: The Ultimate Identity Crisis. *Front. Immunol.* 5.

Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., et al. (2008). Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 321, 974–977.

Barouch, D.H., Whitney, J.B., Moldt, B., Klein, F., Oliveira, T.Y., Liu, J., Stephenson, K.E., Chang, H.-W., Shekhar, K., Gupta, S., et al. (2013). Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. *Nature* 503, 224–228.

Beers, S.A., French, R.R., Chan, H.T.C., Lim, S.H., Jarrett, T.C., Vidal, R.M., Wijayaweera, S.S., Dixon, S.V., Kim, H., Cox, K.L., et al. (2010). Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood* 115, 5191–5201.

Bergmann, C., Strauss, L., Zeidler, R., Lang, S., and Whiteside, T.L. (2007). Expansion and characteristics of human T regulatory type 1 cells in co-cultures simulating tumor microenvironment. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 56, 1429–1442.

Beum, P.V., Peek, E.M., Lindorfer, M.A., Beurskens, F.J., Engelberts, P.J., Parren, P.W.H.I., van de Winkel, J.G.J., and Taylor, R.P. (2011). Loss of CD20 and bound CD20 antibody from opsonized B cells occurs more rapidly because of trogocytosis mediated by Fc receptor-expressing effector cells than direct internalization by the B cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 3438–3447.

Bezombes, C., Grazide, S., Garret, C., Fabre, C., Quillet-Mary, A., Müller, S., Jaffr  zou, J.-P., and Laurent, G. (2004). Rituximab antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase activation in raft microdomains. *Blood* 104, 1166–1173.

Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* 11, 889–896.

Bodogai, M., Lee Chang, C., Wejksza, K., Lai, J., Merino, M., Wersto, R.P., Gress, R.E., Chan, A.C., Hesdorffer, C., and Biragyn, A. (2013). Anti-CD20 antibody promotes cancer escape via enrichment of tumor-evoked regulatory B cells expressing low levels of CD20 and CD137L. *Cancer Res.* 73, 2127–2138.

Boffetta, P. (2011). I. Epidemiology of adult non-Hodgkin lymphoma. *Ann. Oncol.* 22, iv27–iv31.

De Bono, J.S., Rha, S.Y., Stephenson, J., Schultes, B.C., Monroe, P., Eckhardt, G.S., Hammond, L.A., Whiteside, T.L., Nicodemus, C.F., Cermak, J.M., et al. (2004). Phase I trial of a murine antibody to MUC1 in patients with metastatic cancer: evidence for the activation of humoral and cellular antitumor immunity. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 15, 1825–1833.

Boon, T., Gajewski, T.F., and Coulie, P.G. (1995). From defined human tumor antigens to effective immunization? *Immunol. Today* 16, 334–336.

Borg, C., Jalil, A., Laderach, D., Maruyama, K., Wakasugi, H., Charrier, S., Ryffel, B., Cambi, A., Figdor, C., Vainchenker, W., et al. (2004). NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* 104, 3267–3275.

Bouchlaka, M.N., Sckisel, G.D., Chen, M., Mirsoian, A., Zamora, A.E., Maverakis, E., Wilkins, D.E.C., Alderson, K.L., Hsiao, H.-H., Weiss, J.M., et al. (2013). Aging predisposes to acute inflammatory induced pathology after tumor immunotherapy. *J. Exp. Med.* 210, 2223–2237.

Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Chow, L.Q.M., Hwu, W.-J., Topalian, S.L., Hwu, P., Drake, C.G., Camacho, L.H., Kauh, J., Odunsi, K., et al. (2012). Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 2455–2465.

Brichard, V.G., and Lejeune, D. (2007). GSK's antigen-specific cancer immunotherapy programme: pilot results leading to Phase III clinical development. *Vaccine* 25 Suppl 2, B61–B71.

Buhmann, R., Michael, S., Juergen, H., Horst, L., Peschel, C., and Kolb, H.-J. (2013). Immunotherapy with FBTA05 (Bi20), a trifunctional bispecific anti-CD3 x anti-CD20 antibody and donor lymphocyte infusion (DLI) in relapsed or refractory B-cell lymphoma after allogeneic stem cell transplantation: study protocol of an investigator-driven, open-label, non-randomized, uncontrolled, dose-escalating Phase I/II-trial. *J. Transl. Med.* 11, 160.

Burnet, M. (1957). Cancer—A Biological Approach: III. Viruses Associated with Neoplastic Conditions. IV. Practical Applications. *Br. Med. J.* 1, 841.

Byrd, J.C., Kitada, S., Flinn, I.W., Aron, J.L., Pearson, M., Lucas, D., and Reed, J.C. (2002). The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood* 99, 1038–1043.

Camilleri-Broët, S., Cassard, L., Broët, P., Delmer, A., Touneau, A.L., Diebold, J., Fridman, W.H., Molina, T.J., and Sautès-Fridman, C. (2004). FcγRIIB is differentially expressed during B cell maturation and in B-cell lymphomas. *Br. J. Haematol.* 124, 55–62.

Carbone, A., Vaccher, E., Gloghini, A., Pantanowitz, L., Abayomi, A., de Paoli, P., and Franceschi, S. (2014). Diagnosis and management of lymphomas and other cancers in HIV-infected patients. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11, 223–238.

Carmenate, T., Pacios, A., Enamorado, M., Moreno, E., Garcia-Martínez, K., Fuente, D., and León, K. (2013). Human IL-2 mutein with higher antitumor efficacy than wild type IL-2. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 6230–6238.

Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Roncador, G., Villamor, N., Colomo, L., Martinez, A., Hamoudi, R., Howat, W.J., Montserrat, E., and Campo, E. (2009a). High Numbers of Tumor-Infiltrating Programmed Cell Death 1–Positive Regulatory Lymphocytes Are Associated With Improved Overall Survival in Follicular Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 27, 1470–1476.

Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Roncador, G., Villamor, N., Colomo, L., Martinez, A., Hamoudi, R., Howat, W.J., Montserrat, E., and Campo, E. (2009b). High Numbers of Tumor-Infiltrating Programmed Cell Death 1–Positive Regulatory Lymphocytes Are Associated With Improved Overall Survival in Follicular Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 27, 1470–1476.

Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., and Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99, 754–758.

Cartron, G., Watier, H., Golay, J., and Solal-Celigny, P. (2004). From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 104, 2635–2642.

Cartron, G., Zhao-Yang, L., Baudard, M., Kanouni, T., Rouillé, V., Quittet, P., Klein, B., and Rossi, J.-F. (2008). Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Potentiates Rituximab in Patients With Relapsed Follicular Lymphoma: Results of a Phase II Study. *J. Clin. Oncol.* 26, 2725–2731.

Cejas, P., Casado, E., Belda-Iniesta, C., Castro, J.D., Espinosa, E., Redondo, A., Sereno, M., García-Cabezas, M.Á., Vara, J.A.F., Domínguez-Cáceres, A., et al. (2004). Implications of Oxidative Stress and Cell Membrane Lipid Peroxidation in Human Cancer (Spain). *Cancer Causes Control* 15, 707–719.

Chandrasekaran, E.V., Xue, J., Neelamegham, S., and Matta, K.L. (2006). The pattern of glycosyl- and sulfotransferase activities in cancer cell lines: a predictor of individual cancer-

associated distinct carbohydrate structures for the structural identification of signature glycans. *Carbohydr. Res.* *341*, 983–994.

Chelius, D., Ruf, P., Gruber, P., Plösch, M., Liedtke, R., Gansberger, E., Hess, J., Wasiliu, M., and Lindhofer, H. (2010). Structural and functional characterization of the trifunctional antibody catumaxomab. *mAbs* *2*, 309–319.

Cheson, B.D. (2010). Ofatumumab, a Novel Anti-CD20 Monoclonal Antibody for the Treatment of B-Cell Malignancies. *J. Clin. Oncol.* *28*, 3525–3530.

Chodon, T., Comin-Anduix, B., Chmielowski, B., Koya, R.C., Wu, Z., Auerbach, M., Ng, C., Avramis, E., Seja, E., Villanueva, A., et al. (2014). Adoptive transfer of MART-1 T-cell receptor transgenic lymphocytes and dendritic cell vaccination in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 2457–2465.

Conde, L., Halperin, E., Akers, N.K., Brown, K.M., Smedby, K.E., Rothman, N., Nieters, A., Slager, S.L., Brooks-Wilson, A., Agana, L., et al. (2010). Genome-wide association study of follicular lymphoma identifies a risk locus at 6p21.32. *Nat. Genet.* *42*, 661–664.

Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., van der Bruggen, P., and Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 135–146.

Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* *10*, 942–949.

Daëron, M., Latour, S., Malbec, O., Espinosa, E., Pina, P., Pasmans, S., and Fridman, W.H. (1995). The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity* *3*, 635–646.

Davila, M.L., Riviere, I., Wang, X., Bartido, S., Park, J., Curran, K., Chung, S.S., Stefanski, J., Borquez-Ojeda, O., Olszewska, M., et al. (2014). Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci. Transl. Med.* *6*, 224ra25–ra224ra25.

Davis, T.A., Maloney, D.G., Grillo-López, A.J., White, C.A., Williams, M.E., Weiner, G.J., Dowden, S., and Levy, R. (2000). Combination Immunotherapy of Relapsed or Refractory Low-Grade or Follicular Non-Hodgkin's Lymphoma with Rituximab and Interferon- α -2a. *Clin. Cancer Res.* 6, 2644–2652.

Deligne, C., Metidji, A., Fridman, W.-H., and Teillaud, J.-L. (2014). Anti-CD20 therapy induces a memory Th1 response through the IFN- γ /IL-12 axis and prevents protumor regulatory T-cell expansion in mice. *Leukemia*.

Dhodapkar, M.V., Sznol, M., Zhao, B., Wang, D., Carvajal, R.D., Keohan, M.L., Chuang, E., Sanborn, R.E., Lutzky, J., Powderly, J., et al. (2014). Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. *Sci. Transl. Med.* 6, 232ra51.

Dieu-Nosjean, M.-C., Antoine, M., Danel, C., Heudes, D., Wislez, M., Poulot, V., Rabbe, N., Laurans, L., Tartour, E., de Chaisemartin, L., et al. (2008). Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 4410–4417.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 329–360.

Elder, G.J., Hersey, P., and Branley, P. (1997). Remission of transplanted melanoma--clinical course and tumour cell characterisation. *Clin. Transplant.* 11, 565–568.

Elinav, E., Nowarski, R., Thaiss, C.A., Hu, B., Jin, C., and Flavell, R.A. (2013). Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat. Rev. Cancer* 13, 759–771.

Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G., and Schindler, D.G. (1993). Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 720–724.

Fecci, P.E., Sweeney, A.E., Grossi, P.M., Nair, S.K., Learn, C.A., Mitchell, D.A., Cui, X., Cummings, T.J., Bigner, D.D., Gilboa, E., et al. (2006). Systemic anti-CD25 monoclonal antibody administration safely enhances immunity in murine glioma without eliminating regulatory T cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 4294–4305.

Flanagan, S.P. (1966). “Nude”, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res.* 8, 295–309.

Fridman, W.H., Bonnerot, C., Daeron, M., Amigorena, S., Teillaud, J.L., and Sautès, C. (1992). Structural bases of Fc gamma receptor functions. *Immunol. Rev.* 125, 49–76.

Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 12, 298–306.

Friedberg, J.W., Neuberg, D., Gribben, J.G., Fisher, D.C., Canning, C., Koval, M., Poor, C.M., Green, L.M., Daley, J., Soiffer, R., et al. (2002). Combination immunotherapy with rituximab and interleukin 2 in patients with relapsed or refractory follicular non-Hodgkin’s lymphoma. *Br. J. Haematol.* 117, 828–834.

Fruchon, S., Kheirallah, S., Al Saati, T., Ysebaert, L., Laurent, C., Leseux, L., Fournié, J.J., Laurent, G., and Bezombes, C. (2012). Involvement of the Syk-mTOR pathway in follicular lymphoma cell invasion and angiogenesis. *Leukemia* 26, 795–805.

Di Gaetano, N., Cittera, E., Nota, R., Vecchi, A., Grieco, V., Scanziani, E., Botto, M., Introna, M., and Golay, J. (2003). Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 171, 1581–1587.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960–1964.

Gangadhar, T.C., and Vonderheide, R.H. (2014). Mitigating the toxic effects of anticancer immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11, 91–99.

Gao, Q., Qiu, S.-J., Fan, J., Zhou, J., Wang, X.-Y., Xiao, Y.-S., Xu, Y., Li, Y.-W., and Tang, Z.-Y. (2007). Intratumoral Balance of Regulatory and Cytotoxic T Cells Is Associated With Prognosis of Hepatocellular Carcinoma After Resection. *J. Clin. Oncol.* 25, 2586–2593.

Germain, C., Gnjjatic, S., Tamzalit, F., Knockaert, S., Remark, R., Goc, J., Lepelley, A., Becht, E., Katsahian, S., Bizouard, G., et al. (2014). Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 832–844.

Gibson, T.M., Engels, E.A., Clarke, C.A., Lynch, C.F., Weisenburger, D.D., and Morton, L.M. (2014). Risk of diffuse large B-cell lymphoma after solid organ transplantation in the United States. *Am. J. Hematol.* 89, 714–720.

Gluck, W.L., Hurst, D., Yuen, A., Levine, A.M., Dayton, M.A., Gockerman, J.P., Lucas, J., Denis-Mize, K., Tong, B., Navis, D., et al. (2004). Phase I Studies of Interleukin (IL)-2 and Rituximab in B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma IL-2 Mediated Natural Killer Cell Expansion Correlations with Clinical Response. *Clin. Cancer Res.* 10, 2253–2264.

Gnjjatic, S., Nishikawa, H., Jungbluth, A.A., Güre, A.O., Ritter, G., Jäger, E., Knuth, A., Chen, Y., and Old, L.J. (2006). NY-ESO-1: Review of an Immunogenic Tumor Antigen. In *Advances in Cancer Research*, and G.K. George F. Vande Woude, ed. (Academic Press), pp. 1–30.

Goc, J., Fridman, W.-H., Sautès-Fridman, C., and Dieu-Nosjean, M.-C. (2013). Characteristics of tertiary lymphoid structures in primary cancers. *Oncoimmunology* 2, e26836.

Goede, V., Fischer, K., Busch, R., Engelke, A., Eichhorst, B., Wendtner, C.M., Chagorova, T., de la Serna, J., Dilhuydy, M.-S., Illmer, T., et al. (2014). Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N. Engl. J. Med.* 370, 1101–1110.

Goel, H.L., and Mercurio, A.M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nat. Rev. Cancer* 13, 871–882.

Golay, J., Roit, F.D., Bologna, L., Ferrara, C., Leusen, J.H., Rambaldi, A., Klein, C., and Introna, M. (2013). Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and

mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab. *Blood* 122, 3482–3491.

Grant, G.A., and Miller, J.F. (1965). Effect of neonatal thymectomy on the induction of sarcomata in C57 BL mice. *Nature* 205, 1124–1125.

Grinberg-Bleyer, Y., Baeyens, A., You, S., Elhage, R., Fourcade, G., Gregoire, S., Cagnard, N., Carpentier, W., Tang, Q., Bluestone, J., et al. (2010). IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 207, 1871–1878.

Grube, M., Rezvani, K., Wiestner, A., Fujiwara, H., Sconocchia, G., Melenhorst, J.J., Hensel, N., Marti, G.E., Kwak, L.W., Wilson, W., et al. (2004). Autoreactive, Cytotoxic T Lymphocytes Specific for Peptides Derived from Normal B-Cell Differentiation Antigens in Healthy Individuals and Patients with B-Cell Malignancies. *Clin. Cancer Res.* 10, 1047–1056.

Hartemann, A., Bensimon, G., Payan, C.A., Jacqueminet, S., Bourron, O., Nicolas, N., Fonfrede, M., Rosenzweig, M., Bernard, C., and Klatzmann, D. (2013). Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 1, 295–305.

Heijnen, I.A., van Vugt, M.J., Fanger, N.A., Graziano, R.F., de Wit, T.P., Hofhuis, F.M., Guyre, P.M., Capel, P.J., Verbeek, J.S., and van de Winkel, J.G. (1996). Antigen targeting to myeloid-specific human Fc gamma RI/CD64 triggers enhanced antibody responses in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 97, 331–338.

Henney, C.S., Kuribayashi, K., Kern, D.E., and Gillis, S. (1981). Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* 291, 335–338.

Herbst, R.S., Soria, J.-C., Kowanetz, M., Fine, G.D., Hamid, O., Gordon, M.S., Sosman, J.A., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Gettinger, S.N., et al. (2014). Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515, 563–567.

Hilchey, S.P., Hyrien, O., Mosmann, T.R., Livingstone, A.M., Friedberg, J.W., Young, F., Fisher, R.I., Kelleher, R.J., Bankert, R.B., and Bernstein, S.H. (2009). Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotype-specific T-cell response in

patients with follicular lymphoma: support for a “vaccinal effect” of rituximab. *Blood* 113, 3809–3812.

Hodi, F.S., O’Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 711–723.

Hofmeister, J.K., Cooney, D., and Coggeshall, K.M. (2000). Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis. *Blood Cells. Mol. Dis.* 26, 133–143.

Holliger, P., Prospero, T., and Winter, G. (1993). “Diabodies”: small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 6444–6448.

Horikawa, M., Minard-Colin, V., Matsushita, T., and Tedder, T.F. (2011). Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 4268–4280.

Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., and Isaacson, P.G. (2008). Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood* 112, 4384–4399.

Jefferis, R. (2009). Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 226–234.

Kalergis, A.M., and Ravetch, J.V. (2002a). Inducing Tumor Immunity through the Selective Engagement of Activating Fcγ Receptors on Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* 195, 1653–1659.

Kalergis, A.M., and Ravetch, J.V. (2002b). Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fcγ receptors on dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195, 1653–1659.

Kalos, M., Levine, B.L., Porter, D.L., Katz, S., Grupp, S.A., Bagg, A., and June, C.H. (2011). T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. *Sci. Transl. Med.* 3, 95ra73.

Karpovsky, B., Titus, J.A., Stephany, D.A., and Segal, D.M. (1984). Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc gamma receptor antibodies. *J. Exp. Med.* 160, 1686–1701.

Khan, K.D., Emmanouilides, C., Benson, D.M., Hurst, D., Garcia, P., Michelson, G., Milan, S., Ferketich, A.K., Piro, L., Leonard, J.P., et al. (2006). A phase 2 study of rituximab in combination with recombinant interleukin-2 for rituximab-refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 7046–7053.

Kim, J.M., and Ashkenazi, A. (2013). Fcγ receptors enable anticancer action of proapoptotic and immune-modulatory antibodies. *J. Exp. Med.* *210*, 1647–1651.

Kipps, T.J., Parham, P., Punt, J., and Herzenberg, L.A. (1985). Importance of immunoglobulin isotype in human antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity directed by murine monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* *161*, 1–17.

Klein, C., Lammens, A., Schäfer, W., Georges, G., Schwaiger, M., Mössner, E., Hopfner, K.-P., Umaña, P., and Niederfellner, G. (2013). Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *mAbs* *5*, 22–33.

Koch, M.A., Tucker-Heard, G., Perdue, N.R., Killebrew, J.R., Urdahl, K.B., and Campbell, D.J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.* *10*, 595–602.

Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* *450*, 903–907.

Köhler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* *256*, 495–497.

Kohrt, H.E., Houot, R., Goldstein, M.J., Weiskopf, K., Alizadeh, A.A., Brody, J., Müller, A., Pachynski, R., Czerwinski, D., Coutre, S., et al. (2011). CD137 stimulation enhances the antilymphoma activity of anti-CD20 antibodies. *Blood* *117*, 2423–2432.

Kohrt, H.E., Thielens, A., Marabelle, A., Sagiv-Barfi, I., Sola, C., Chanuc, F., Fuseri, N., Bonnafoos, C., Czerwinski, D., Rajapaksa, A., et al. (2014a). Anti-KIR antibody enhancement of anti-lymphoma activity of natural killer cells as monotherapy and in combination with anti-CD20 antibodies. *Blood* *123*, 678–686.

Kohrt, H.E., Sagiv-Barfi, I., Rafiq, S., Herman, S.E.M., Butchar, J.P., Cheney, C., Zhang, X., Buggy, J.J., Muthusamy, N., Levy, R., et al. (2014b). Ibrutinib antagonizes rituximab-dependent NK cell-mediated cytotoxicity. *Blood* 123, 1957–1960.

Kokolus, K.M., Capitano, M.L., Lee, C.-T., Eng, J.W.-L., Waight, J.D., Hylander, B.L., Sexton, S., Hong, C.-C., Gordon, C.J., Abrams, S.I., et al. (2013). Baseline tumor growth and immune control in laboratory mice are significantly influenced by subthermoneutral housing temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 20176–20181.

Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* 182, 459–465.

Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 5, 251–262.

Lam, K.P., Kühn, R., and Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90, 1073–1083.

Lameris, R., de Bruin, R.C.G., Schneiders, F.L., van Bergen En Henegouwen, P.M.P., Verheul, H.M.W., de Gruijl, T.D., and van der Vliet, H.J. (2014). Bispecific antibody platforms for cancer immunotherapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*

Larmonier, N., Fraszczak, J., Lakomy, D., Bonnotte, B., and Katsanis, E. (2010). Killer dendritic cells and their potential for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 1–11.

Lee, S.C., Srivastava, R.M., López-Albaitero, A., Ferrone, S., and Ferris, R.L. (2011). Natural killer (NK): dendritic cell (DC) cross talk induced by therapeutic monoclonal antibody triggers tumor antigen-specific T cell immunity. *Immunol. Res.* 50, 248–254.

Leidi, M., Gotti, E., Bologna, L., Miranda, E., Rimoldi, M., Sica, A., Roncalli, M., Palumbo, G.A., Introna, M., and Golay, J. (2009). M2 macrophages phagocytose rituximab-opsonized leukemic targets more efficiently than m1 cells in vitro. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 182, 4415–4422.

Leseux, L., Laurent, G., Laurent, C., Rigo, M., Blanc, A., Olive, D., and Bezombes, C. (2008). PKC ζ -mTOR pathway: a new target for rituximab therapy in follicular lymphoma. *Blood* 111, 285–291.

Levy, R., Ganjoo, K.N., Leonard, J.P., Vose, J.M., Flinn, I.W., Ambinder, R.F., Connors, J.M., Berinstein, N.L., Belch, A.R., Bartlett, N.L., et al. (2014). Active idiotypic vaccination versus control immunotherapy for follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32, 1797–1803.

Lisio, L.D., Martinez, N., Montes-Moreno, S., Piris-Villaespesa, M., Sanchez-Beato, M., and Piris, M.A. (2012). The role of miRNAs in the pathogenesis and diagnosis of B-cell lymphomas. *Blood* 120, 1782–1790.

Liu, Y., Gao, X., Masuda, E., Redecha, P.B., Blank, M.C., and Pricop, L. (2006). Regulated expression of Fc γ R in human dendritic cells controls cross-presentation of antigen-antibody complexes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 8440–8447.

Loeffler, M., Kreuz, M., Haake, A., Hasenclever, D., Trautmann, H., Arnold, C., Winter, K., Koch, K., Klapper, W., Scholtysik, R., et al. (2014). Genomic and epigenomic co-evolution in follicular lymphomas. *Leukemia*.

Maeshima, A.M., Taniguchi, H., Fukuhara, S., Morikawa, N., Munakata, W., Maruyama, D., Kim, S.-W., Watanabe, T., Kobayashi, Y., Tobinai, K., et al. (2013). Follow-up data of 10 patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma with a CD20-negative phenotypic change after rituximab-containing therapy. *Am. J. Surg. Pathol.* 37, 563–570.

Mahmoud, S.M.A., Paish, E.C., Powe, D.G., Macmillan, R.D., Grainge, M.J., Lee, A.H.S., Ellis, I.O., and Green, A.R. (2011). Tumor-infiltrating CD8⁺ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 1949–1955.

Maleckar, J.R., and Sherman, L.A. (1987). The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 138, 3873–3876.

Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M.G., Piccinini, M.P., Maggi, E., Trinchieri, G., and Romagnani, S. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.* 177, 1199–1204.

- Manshouri, T., Do, K., Wang, X., Giles, F.J., O'Brien, S.M., Saffer, H., Thomas, D., Jilani, I., Kantarjian, H.M., Keating, M.J., et al. (2003). Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance. *Blood* *101*, 2507–2513.
- Martinet, L., Garrido, I., Filleron, T., Le Guellec, S., Bellard, E., Fournie, J.-J., Rochaix, P., and Girard, J.-P. (2011). Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* *71*, 5678–5687.
- Maude, S.L., Frey, N., Shaw, P.A., Aplenc, R., Barrett, D.M., Bunin, N.J., Chew, A., Gonzalez, V.E., Zheng, Z., Lacey, S.F., et al. (2014). Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N. Engl. J. Med.* *371*, 1507–1517.
- Maus, M.V., Grupp, S.A., Porter, D.L., and June, C.H. (2014). Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood* *123*, 2625–2635.
- McGaha, T.L., Karlsson, M.C.I., and Ravetch, J.V. (2008). FcγRIIB deficiency leads to autoimmunity and a defective response to apoptosis in Mrl-MpJ mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 5670–5679.
- Meerten, T. van, Rijn, R.S. van, Hol, S., Hagenbeek, A., and Ebeling, S.B. (2006). Complement-Induced Cell Death by Rituximab Depends on CD20 Expression Level and Acts Complementary to Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *Clin. Cancer Res.* *12*, 4027–4035.
- Michon, J., Moutel, S., Barbet, J., Romet-Lemonne, J.L., Deo, Y.M., Fridman, W.H., and Teillaud, J.L. (1995). In vitro killing of neuroblastoma cells by neutrophils derived from granulocyte colony-stimulating factor-treated cancer patients using an anti-disialoganglioside/anti-Fc gamma RI bispecific antibody. *Blood* *86*, 1124–1130.
- Milstein, C., and Cuello, A.C. (1984). Hybrid hybridomas and the production of bi-specific monoclonal antibodies. *Immunol. Today* *5*, 299–304.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* *30*, 899–911.

Miyoshi, H., Arakawa, F., Sato, K., Kimura, Y., Kiyasu, J., Takeuchi, M., Yoshida, M., Ichikawa, A., Ishibashi, Y., Nakamura, Y., et al. (2012). Comparison of CD20 expression in B-cell lymphoma between newly diagnosed, untreated cases and those after rituximab treatment. *Cancer Sci.* *103*, 1567–1573.

Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Berger, A., Bindea, G., Meatchi, T., Bruneval, P., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., Pagès, F., et al. (2011). Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 610–618.

Montalvao, F., Garcia, Z., Celli, S., Breart, B., Deguine, J., Van Rooijen, N., and Bousso, P. (2013). The mechanism of anti-CD20-mediated B cell depletion revealed by intravital imaging. *J. Clin. Invest.* *123*, 5098–5103.

Moore, A.C., Gallimore, A., Draper, S.J., Watkins, K.R., Gilbert, S.C., and Hill, A.V.S. (2005). Anti-CD25 antibody enhancement of vaccine-induced immunogenicity: increased durable cellular immunity with reduced immunodominance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 7264–7273.

Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A., and Oi, V.T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 6851–6855.

Mortenson, E.D., Park, S., Jiang, Z., Wang, S., and Fu, Y.-X. (2013). Effective anti-neu-initiated antitumor responses require the complex role of CD4⁺ T cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 1476–1486.

Mössner, E., Brünker, P., Moser, S., Püntener, U., Schmidt, C., Herter, S., Grau, R., Gerdes, C., Nopora, A., Puijenbroek, E. van, et al. (2010). Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* *115*, 4393–4402.

Motzer, R.J., Rini, B.I., McDermott, D.F., Redman, B.G., Kuzel, T.M., Harrison, M.R., Vaishampayan, U.N., Drabkin, H.A., George, S., Logan, T.F., et al. (2014). Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*

- Muhammad, K., Roll, P., Einsele, H., Dörner, T., and Tony, H.-P. (2009). Delayed acquisition of somatic hypermutations in repopulated IGD+CD27+ memory B cell receptors after rituximab treatment. *Arthritis Rheum.* *60*, 2284–2293.
- Mulé, J.J., Shu, S., Schwarz, S.L., and Rosenberg, S.A. (1984). Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science* *225*, 1487–1489.
- Muranski, P., and Restifo, N.P. (2013). Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* *121*, 2402–2414.
- Nadler, L.M., Stashenko, P., Hardy, R., Kaplan, W.D., Button, L.N., Kufe, D.W., Antman, K.H., and Schlossman, S.F. (1980). Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen. *Cancer Res.* *40*, 3147–3154.
- Nagorsen, D., Kufer, P., Baeuerle, P.A., and Bargou, R. (2012). Blinatumomab: A historical perspective. *Pharmacol. Ther.* *136*, 334–342.
- Nasser, R., Pelegrin, M., Plays, M., Gros, L., and Piechaczyk, M. (2013). Control of regulatory T cells is necessary for vaccine-like effects of antiviral immunotherapy by monoclonal antibodies. *Blood* *121*, 1102–1111.
- Van der Neut Kolfshoten, M., Schuurman, J., Losen, M., Bleeker, W.K., Martínez-Martínez, P., Vermeulen, E., den Bleker, T.H., Wiegman, L., Vink, T., Aarden, L.A., et al. (2007). Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* *317*, 1554–1557.
- Neyt, K., Perros, F., GeurtsvanKessel, C.H., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2012). Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol.* *33*, 297–305.
- Niitsu, N., Hayama, M., Okamoto, M., Khorii, M., Higashihara, M., Tamaru, J., and Hirano, M. (2004). Phase I Study of Rituximab-CHOP Regimen in Combination with Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Patients with Follicular Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* *10*, 4077–4082.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2006). Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* *24*, 19–28.

Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 34–47.

Nishikawa, H., and Sakaguchi, S. (2014). Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 27, 1–7.

Nishizuka, Y., Nakakuki, K., and Usui, M. (1965). Enhancing Effect of Thymectomy on Hepatotumorigenesis in Swiss Mice following Neonatal Injection of 20-Methylcholanthrene. *Nature* 205, 1236–1238.

Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.-L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., et al. (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* 13, 54–61.

Oflazoglu, E., and Audoly, L.P. (2010). Evolution of anti-CD20 monoclonal antibody therapeutics in oncology. *mAbs* 2, 14–19.

O’Keefe, T.L., Williams, G.T., Davies, S.L., and Neuberger, M.S. (1998). Mice carrying a CD20 gene disruption. *Immunogenetics* 48, 125–132.

O’Sullivan, T., Saddawi-Konefka, R., Vermi, W., Koebel, C.M., Arthur, C., White, J.M., Uppaluri, R., Andrews, D.M., Ngiow, S.F., Teng, M.W.L., et al. (2012). Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *J. Exp. Med.* 209, 1869–1882.

Ott, G., Rosenwald, A., and Campo, E. (2013). Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood* 122, 3884–3891.

Page, D.B., Postow, M.A., Callahan, M.K., Allison, J.P., and Wolchok, J.D. (2014). Immune modulation in cancer with antibodies. *Annu. Rev. Med.* 65, 185–202.

Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molitor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., et al. (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 2654–2666.

Park, S., Jiang, Z., Mortenson, E.D., Deng, L., Radkevich-Brown, O., Yang, X., Sattar, H., Wang, Y., Brown, N.K., Greene, M., et al. (2010). The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer Cell* 18, 160–170.

- Pepper, M., and Jenkins, M.K. (2011). Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nat. Immunol.* 12, 467–471.
- Pere, H., Montier, Y., Bayry, J., Quintin-Colonna, F., Merillon, N., Dransart, E., Badoual, C., Gey, A., Ravel, P., Marcheteau, E., et al. (2011). A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8⁺ T cells and tumor immunity against self antigens. *Blood* 118, 4853–4862.
- Platonova, S., Cherfils-Vicini, J., Damotte, D., Crozet, L., Vieillard, V., Validire, P., André, P., Dieu-Nosjean, M.-C., Alifano, M., Régnard, J.-F., et al. (2011). Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res.* 71, 5412–5422.
- Powles, T., Eder, J.P., Fine, G.D., Braith, F.S., Loriot, Y., Cruz, C., Bellmunt, J., Burris, H.A., Petrylak, D.P., Teng, S., et al. (2014). MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 515, 558–562.
- Qin, Z., Richter, G., Schüler, T., Ibe, S., Cao, X., and Blankenstein, T. (1998). B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat. Med.* 4, 627–630.
- Raulet, D.H., and Guerra, N. (2009). Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 568–580.
- Reff, M.E., Carner, K., Chambers, K.S., Chinn, P.C., Leonard, J.E., Raab, R., Newman, R.A., Hanna, N., and Anderson, D.R. (1994). Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83, 435–445.
- Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Théry, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., et al. (1999). Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189, 371–380.
- Remark, R., Alifano, M., Cremer, I., Lupo, A., Dieu-Nosjean, M.-C., Riquet, M., Crozet, L., Ouakrim, H., Goc, J., Cazes, A., et al. (2013). Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 4079–4091.

Restifo, N.P., Dudley, M.E., and Rosenberg, S.A. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 269–281.

Rickert, R.C. (2013). New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 578–591.

Ridgway, J.B., Presta, L.G., and Carter, P. (1996). “Knobs-into-holes” engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng.* *9*, 617–621.

Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O’Day, S., Weber, J., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J.-F., Testori, A., Grob, J.-J., et al. (2011). Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *364*, 2517–2526.

De Romeuf, C., Dutertre, C.-A., Le Garff-Tavernier, M., Fournier, N., Gaucher, C., Glacet, A., Jorieux, S., Bihoreau, N., Behrens, C.K., Béliard, R., et al. (2008). Chronic lymphocytic leukaemia cells are efficiently killed by an anti-CD20 monoclonal antibody selected for improved engagement of FcγRIIIA/CD16. *Br. J. Haematol.* *140*, 635–643.

Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Leitman, S., Chang, A.E., Ettinghausen, S.E., Matory, Y.L., Skibber, J.M., Shiloni, E., Vetto, J.T., et al. (1985). Observations on the Systemic Administration of Autologous Lymphokine-Activated Killer Cells and Recombinant Interleukin-2 to Patients with Metastatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* *313*, 1485–1492.

Rosenberg, S.A., Spiess, P., and Lafreniere, R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* *233*, 1318–1321.

Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Chang, A.E., Avis, F.P., Leitman, S., Linehan, W.M., Robertson, C.N., Lee, R.E., and Rubin, J.T. (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* *316*, 889–897.

Rossi, E.A., Goldenberg, D.M., Cardillo, T.M., Stein, R., and Chang, C.-H. (2009). CD20-targeted tetrameric interferon- α , a novel and potent immunocytokine for the therapy of B-cell lymphomas. *Blood* *114*, 3864–3871.

Rozan, C., Cornillon, A., Pétiard, C., Chartier, M., Behar, G., Boix, C., Kerfelec, B., Robert, B., Pèleguin, A., Chames, P., et al. (2013). Single-domain antibody-based and linker-free

bispecific antibodies targeting Fc γ RIII induce potent antitumor activity without recruiting regulatory T cells. *Mol. Cancer Ther.* 12, 1481–1491.

Sacchi, S., Federico, M., Vitolo, U., Boccomini, C., Vallisa, D., Baldini, L., Petrini, M., Rupoli, S., Di Raimondo, F., Merli, F., et al. (2001). Clinical activity and safety of combination immunotherapy with IFN-alpha 2a and Rituximab in patients with relapsed low grade non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 86, 951–958.

Saito, T., Wada, H., Yamasaki, M., Miyata, H., Nishikawa, H., Sato, E., Kageyama, S., Shiku, H., Mori, M., and Doki, Y. (2014). High expression of MAGE-A4 and MHC class I antigens in tumor cells and induction of MAGE-A4 immune responses are prognostic markers of CHP-MAGE-A4 cancer vaccine. *Vaccine* 32, 5901–5907.

Sala, A., Gresser, I., Chassoux, D., Maury, C., Santodonato, L., Eid, P., Maunoury, M.T., Barca, S., Cianfriglia, M., and Belardelli, F. (1992). Inhibition of Friend leukemia cell visceral metastases by a new monoclonal antibody and role of the immune system of the host in its action. *Cancer Res.* 52, 2880–2889.

Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., Platell, C., and Iacopetta, B. (2009). Tumor-Infiltrating FOXP3+ T Regulatory Cells Show Strong Prognostic Significance in Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 186–192.

Salles, G., Mounier, N., Guibert, S. de, Morschhauser, F., Doyen, C., Rossi, J.-F., Haioun, C., Brice, P., Mahé, B., Bouabdallah, R., et al. (2008). Rituximab combined with chemotherapy and interferon in follicular lymphoma patients: results of the GELA-GOELAMS FL2000 study. *Blood* 112, 4824–4831.

Sansom, J.N., van Berkel, L.A., van Helvoort, J.M.L.M., Unger, W.W.J., Jansen, W., Thepen, T., Mebius, R.E., Verbeek, S.S., and Kraal, G. (2005). Fc gamma RIIB regulates nasal and oral tolerance: a role for dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 5279–5287.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 331, 1565–1570.

Sehn, L.H., Goy, A., Offner, F.C., Martinelli, G., Friedberg, J., Lasserre, S.F., Fine, G., and Press, O.W. (2011). Randomized Phase II Trial Comparing GA101 (Obinutuzumab) with

Rituximab in Patients with Relapsed CD20 Indolent B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma: Preliminary Analysis of the GAUSS Study. *ASH Annu. Meet. Abstr.* 118, 269.

Setiady, Y.Y., Coccia, J.A., and Park, P.U. (2010). In vivo depletion of CD4+FOXP3+ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by FcγR3+ phagocytes. *Eur. J. Immunol.* 40, 780–786.

Shen, L., Guyre, P.M., Anderson, C.L., and Fanger, M.W. (1986). Heteroantibody-mediated cytotoxicity: antibody to the high affinity Fc receptor for IgG mediates cytotoxicity by human monocytes that is enhanced by interferon-gamma and is not blocked by human IgG. *J. Immunol. Baltim. Md* 137, 3378–3382.

Simpson, T.R., Li, F., Montalvo-Ortiz, W., Sepulveda, M.A., Bergerhoff, K., Arce, F., Roddie, C., Henry, J.Y., Yagita, H., Wolchok, J.D., et al. (2013). Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J. Exp. Med.* 210, 1695–1710.

Singh, V., Gupta, D., Arora, R., Tripathi, R.P., Almasan, A., and Macklis, R.M. (2014). Surface Levels of CD20 Determine Anti-CD20 Antibodies Mediated Cell Death In Vitro. *PLoS ONE* 9.

Snider, D.P., Kaubisch, A., and Segal, D.M. (1990). Enhanced antigen immunogenicity induced by bispecific antibodies. *J. Exp. Med.* 171, 1957–1963.

Spiess, P.J., Yang, J.C., and Rosenberg, S.A. (1987). In vivo antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes expanded in recombinant interleukin-2. *J. Natl. Cancer Inst.* 79, 1067–1075.

Srivastava, R.M., Lee, S.C., Filho, P.A.A., Lord, C.A., Jie, H.-B., Davidson, H.C., López-Albaitero, A., Gibson, S.P., Gooding, W.E., Ferrone, S., et al. (2013). Cetuximab-Activated Natural Killer and Dendritic Cells Collaborate to Trigger Tumor Antigen-Specific T-cell Immunity in Head and Neck Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* 19, 1858–1872.

Stagg, J., Loi, S., Divisekera, U., Ngiew, S.F., Duret, H., Yagita, H., Teng, M.W., and Smyth, M.J. (2011). Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7142–7147.

Strati, P., Tong, W.-G., Vitale, C., Wierda, W.G., O'Brien, S., Brown, J.R., Weng, W.-K., Kipps, T., Keating, M.J., and Ferrajoli, A. (2014). A phase II study of the combination of rituximab and granulocyte macrophage colony stimulating factor as treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 1–3.

Stutman, O. (1974). Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 183, 534–536.

Sugiyama, D., Nishikawa, H., Maeda, Y., Nishioka, M., Tanemura, A., Katayama, I., Ezoe, S., Kanakura, Y., Sato, E., Fukumori, Y., et al. (2013). Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17945–17950.

Suntharalingam, G., Perry, M.R., Ward, S., Brett, S.J., Castello-Cortes, A., Brunner, M.D., and Panoskaltsis, N. (2006). Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med.* 355, 1018–1028.

Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., and Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* 10, 1969–1980.

Taylor, R.P., and Lindorfer, M.A. (2010). Antigenic modulation and rituximab resistance. *Semin. Hematol.* 47, 124–132.

Taylor, C., Hershman, D., Shah, N., Suci-Foca, N., Petrylak, D.P., Taub, R., Vahdat, L., Cheng, B., Pegram, M., Knutson, K.L., et al. (2007). Augmented HER-2 specific immunity during treatment with trastuzumab and chemotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 5133–5143.

Tedder, T.F., Baras, A., and Xiu, Y. (2006). Fcγ receptor-dependent effector mechanisms regulate CD19 and CD20 antibody immunotherapies for B lymphocyte malignancies and autoimmunity. *Springer Semin. Immunopathol.* 28, 351–364.

Teeling, J.L., French, R.R., Cragg, M.S., van den Brakel, J., Pluyter, M., Huang, H., Chan, C., Parren, P.W.H.I., Hack, C.E., Dechant, M., et al. (2004). Characterization of new human

CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 104, 1793–1800.

Thompson, C.B., and Allison, J.P. (1997). The Emerging Role of CTLA-4 as an Immune Attenuator. *Immunity* 7, 445–450.

Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., and Shevach, E.M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 3433–3441.

Toledano, M., Mathiot, C., Michon, J., Andreu, G., Lando, D., Brandely, M., and Fridman, W.H. (1989). Interferon-gamma (IFN-gamma) and interleukin-2 in the generation of lymphokine-activated killer cell cytotoxicity--IFN-gamma-induced suppressive activity. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 30, 57–64.

Topalian, S.L., Sznol, M., McDermott, D.F., Kluger, H.M., Carvajal, R.D., Sharfman, W.H., Brahmer, J.R., Lawrence, D.P., Atkins, M.B., Powderly, J.D., et al. (2014). Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32, 1020–1030.

Topp, M.S., Gökbuget, N., Stein, A.S., Zugmaier, G., O'Brien, S., Bargou, R.C., Dombret, H., Fielding, A.K., Heffner, L., Larson, R.A., et al. (2014). Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.*

Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 133–146.

Uchida, J., Lee, Y., Hasegawa, M., Liang, Y., Bradney, A., Oliver, J.A., Bowen, K., Steeber, D.A., Haas, K.M., Poe, J.C., et al. (2004). Mouse CD20 expression and function. *Int. Immunol.* 16, 119–129.

Underhill, D.M., and Goodridge, H.S. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 492–502.

Vacchelli, E., Aranda, F., Eggermont, A., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Cremer, I., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2014). Trial Watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology* 3, e27878.

Vermeer, M.H., van Doorn, R., Dukers, D., Bekkenk, M.W., Meijer, C.J., and Willemze, R. (2001). CD8+ T cells in cutaneous T-cell lymphoma: expression of cytotoxic proteins, Fas Ligand, and killing inhibitory receptors and their relationship with clinical behavior. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 19, 4322–4329.

Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523–532.

Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., and Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 239–252.

De Vos, S., Forero-Torres, A., Ansell, S.M., Kahl, B., Cheson, B.D., Bartlett, N.L., Furman, R.R., Winter, J.N., Kaplan, H., Timmerman, J., et al. (2014). A phase II study of dacetuzumab (SGN-40) in patients with relapsed diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and correlative analyses of patient-specific factors. *J. Hematol. Oncol.* J Hematol Oncol 7, 44.

Wahlin, B.E., Sundström, C., Holte, H., Hagberg, H., Erlanson, M., Nilsson-Ehle, H., Lindén, O., Nordström, M., Ostensad, B., Geisler, C.H., et al. (2011). T cells in tumors and blood predict outcome in follicular lymphoma treated with rituximab. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 4136–4144.

Wang, S.-Y., and Weiner, G. (2008). Complement and cellular cytotoxicity in antibody therapy of cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 8, 759–768.

Wang, S.-Y., Veeramani, S., Racila, E., Cagley, J., Fritzinger, D.C., Vogel, C.-W., John, W.S., and Weiner, G.J. (2009). Depletion of the C3 component of complement enhances the ability of rituximab-coated target cells to activate human NK cells and improves the efficacy of monoclonal antibody therapy in an in vivo model. *Blood* 114, 5322–5330.

Weiner, L.M., Holmes, M., Adams, G.P., LaCreta, F., Watts, P., and Garcia de Palazzo, I. (1993). A human tumor xenograft model of therapy with a bispecific monoclonal antibody targeting c-erbB-2 and CD16. *Cancer Res.* 53, 94–100.

Weng, W.-K., and Levy, R. (2003). Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *21*, 3940–3947.

Westin, J.R., Chu, F., Zhang, M., Fayad, L.E., Kwak, L.W., Fowler, N., Romaguera, J., Hagemester, F., Fanale, M., Samaniego, F., et al. (2014). Safety and Activity of PD1 Blockade by Pidilizumab in Combination with Rituximab in Patients with Relapsed Follicular Lymphoma: a Single Group, Open-label, Phase 2 Trial. *Lancet Oncol.* *15*, 69–77.

Westwood, J.A., Darcy, P.K., Guru, P.M., Sharkey, J., Pegram, H.J., Amos, S.M., Smyth, M.J., and Kershaw, M.H. (2010). Three agonist antibodies in combination with high-dose IL-2 eradicate orthotopic kidney cancer in mice. *J. Transl. Med.* *8*, 42.

Wong, S.-C., Puaux, A.-L., Chittezhath, M., Shalova, I., Kajiji, T.S., Wang, X., Abastado, J.-P., Lam, K.-P., and Biswas, S.K. (2010). Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells. *Eur. J. Immunol.* *40*, 2296–2307.

Xuan, C., Steward, K.K., Timmerman, J.M., and Morrison, S.L. (2010). Targeted delivery of interferon-alpha via fusion to anti-CD20 results in potent antitumor activity against B-cell lymphoma. *Blood* *115*, 2864–2871.

Yang, X., Zhang, X., Mortenson, E.D., Radkevich-Brown, O., Wang, Y., and Fu, Y.-X. (2013). Cetuximab-mediated Tumor Regression Depends on Innate and Adaptive Immune Responses. *Mol. Ther.* *21*, 91–100.

Yang, Z.-Z., Grote, D.M., Ziesmer, S.C., Niki, T., Hirashima, M., Novak, A.J., Witzig, T.E., and Ansell, S.M. (2012). IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *J. Clin. Invest.* *122*, 1271–1282.

Yao, S., Zhu, Y., and Chen, L. (2013). Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 130–146.

Younes, A., Thieblemont, C., Morschhauser, F., Flinn, I., Friedberg, J.W., Amorim, S., Hivert, B., Westin, J., Vermeulen, J., Bandyopadhyay, N., et al. (2014). Combination of ibrutinib with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) for treatment-naïve patients with CD20-positive B-cell non-Hodgkin lymphoma: a non-randomised, phase 1b study. *Lancet Oncol.* *15*, 1019–1026.

Zhao, D.-M., Thornton, A.M., DiPaolo, R.J., and Shevach, E.M. (2006). Activated CD4⁺CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* *107*, 3925–3932.

Zhao, L., Tong, Q., Qian, W., Li, B., Zhang, D., Fu, T., Duan, S., Zhang, X., Zhao, J., Dai, J., et al. (2013). Eradication of non-Hodgkin lymphoma through the induction of tumor-specific T-cell immunity by CD20-Flex BiFP. *Blood* *122*, 4230–4236.

Zhu, Z., Prabakaran, P., Chen, W., Broder, C.C., Gong, R., and Dimitrov, D.S. (2013). Human monoclonal antibodies as candidate therapeutics against emerging viruses and HIV-1. *Viol. Sin.* *28*, 71–80.

Zou, W., and Restifo, N.P. (2010). T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 248–256.

Annexes

Annexe I . Revue

Le double visage des anticorps monoclonaux en oncologie : Immunité passive et vaccination

Deligne C, Teillaud JL

Médecine Sciences (Paris). 2013 Jan (1):57-63.

Annexe II. Chapitre d'un livre

The vaccinal effect of monoclonal antibodies in cancer therapy (chapter 24)

Deligne C, Sibérl S, and Teillaud JL

In "Tumour Immunology and Immunotherapy" (R.C. Reed, ed.), Oxford University Press, 2013, pp. 357-371.

Annexe III. Article original

Anti-CD20 therapy induces a memory Th1 response through the IFN- γ /IL-12 axis and prevents protumor regulatory T-cell expansion in mice.

Deligne C, Metidji A, Fridman WH, and Teillaud JL.

Leukemia. 2014 Sep 18. doi: 10.1038/leu.2014.275.

Communications (résumé)

22-27 Aout 2013 : 15th International Congress of Immunology, Milan (Italie)

"Deciphering adaptive anti-tumor immunity induced by anti-CD20 mAb treatment"

Deligne C, Metidji A, Fridman WH and Jean-Luc Teillaud

10-14 Novembre 2014 : 11^{ème} immunotherapy workshop, La Havane (Cuba)

Optimization of the vaccinal effect of anti-CD20 therapy through the combination of anti-CD20 antibody with rationally-engineered rIL-2.

Casadesus-Pasos AV, Deligne C, Hernandez T, Teillaud JL